

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Dragica S. Božić

***IN SILICO, IN VITRO I IN VIVO* ISPITIVANJE
TOKSIČNOSTI KOMBINOVANE PRIMENE
IMUNOMODULATORA SULFORAFANA I
INAKTIVISANE BAKTERIJE *PSEUDOMONAS*
*AERUGINOSA***

Doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Dragica S. Božić

IN SILICO, IN VITRO AND IN VIVO
INVESTIGATION OF THE TOXICITY OF THE
COMBINED APPLICATION OF THE
IMMUNOMODULATOR SULFORAPHANE
AND INACTIVATED BACTERIA
PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Doctoral dissertation

Belgrade, 2024

Mentori

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

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

Članovi komisije

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

dr sc. Zorica Bulat, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

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

dr sc. Zorica Stojić-Vukanić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

dr sc. Tatjana Srdić-Rajić, naučni savetnik
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd

U Beogradu, _____

Ova doktorska disertacija proistekla je iz realizacije strateškog, istraživačko-razvojnog projekta između Republike Srbije i Narodne Republike Kine pod nazivom „Povećanje efikasnosti imunoterapije karcinoma kombinacijom CAR-T ćelija ili PD1/PD-L1 inhibitora sa imunomodulatorima” (451-03-1203/2021-09, period realizacije 01.07.2021-30.06.2024).

Zahvaljujem se Ministarstvu nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije, kao i Ministarstvu nauke i tehnologije Narodne Republike Kine na odabiru projekta i finansijskoj podršci za njegovu realizaciju.

Zahvaljujem se kolegama iz biomedicinskog centra Prve pridružene bolnice Džengdžou univerziteta (Džengdžou, provincija Henan, NR Kina), partnerima na projektu, na saradnji, kao i prilici da se tokom boravka u njihovom centru upoznam sa osnovama imunoterapije.

Posebnu zahvalnost dugujem mentorki prof. dr Danijeli Đukić-Ćosić koja mi je pokazala da je sve moguće, nesebično mi pomogla u svim fazama izrade doktorske disertacije i podržala u svim idejama.

Zahvaljujem se i mentoru dr sc. Aleksandaru Paviću, naučnom savetniku, na pruženoj pomoći tokom izrade doktorske disertacije, dr sc. Tanji Srdić-Rajić, naučnom savetniku, na pomoći pri analizi in vitro rezultata, kao i doc. dr Ivanu Miloševiću na pomoći oko patohistoloških analiza.

Zahvaljujem se članovima komisije na pomoći i sugestijama.

Zahvaljujem se svim profesorkama, koleginicama i zaposlenima Katedre za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović” na podršci i pomoći tokom izrade doktorske disertacije.

Zahvalnost dugujem i porodici na podršci i razumevanju, a posebno suprugu na motivaciji i pomoći koju mi je pružio tokom pisanja doktorske disertacije.

***In silico, in vitro i in vivo* ispitivanje toksičnosti kombinovane primene
imunomodulatora sulforafana i inaktivisane bakterije
*Pseudomonas aeruginosa***

Sažetak

U ovoj doktorskoj disertaciji sveobuhvatno je ispitivana toksičnost imunomodulatora sa antitumorskim potencijalom, hemijski dobijenog sulforafana (SFN) i soja *Pseudomonas aeruginosa* sa hemaglutininskim fimbrijama osetljivim na manozu (PA-MSHA). *In silico* analiza je pokazala da SFN može da izazove oštećenje hromozoma i senzibilizaciju kože, dejstvom na gene uključene u procese imunskog odgovora, oksidativnog statusa i apoptoze, dok PA-MSHA intereaguje sa genima uključenim u proces regulacije imunskog sistema i apoptoze. U *in vitro* uslovima, SFN ostvaruje citotoksičan efekat na ćelije karcinoma kolona i to dominantno na HCT-116 u odnosu na HT-29 ćelije, zaustavljanjem ćelijske deobe u G2/M fazi ćelijskog ciklusa. Citotoksičan potencijal kombinovane primene imunomodulatora dovodi do smrti manjeg broja ćelija karcinoma kolona u odnosu na efekat samog SFN. U *in vivo* ispitivanju na modelu zebrica utvrđene su letalne koncentracije za SFN i PA-MSHA, kao i granični nivoi toksičnosti za praćene efekte na rast i razvoj embriona zebrica. Kombinovana primena SFN i PA-MSHA indukuje štetne efekte na embrionima zebrice u koncentracijama u kojima pojedinačne supstance nisu ispoljile štetan efekat. U *in vivo* istraživanju na modelu pacova praćene su promene hematoloških i biohemijskih parametara, nivoa hormona, produkcije citokina i drugih proteina kao i parametara oksidativnog statusa i patohistološke promene, među kojima se pro- i antiinflamatorni citokini, kao i parametri oksidativnog statusa izdvajaju kao najosetljiviji na dejstvo imunomodulatora. Dodatno, uočene su dozno-zavisne promene većeg broja praćenih efekata nakon primene pojedinačnih imunomodulatora i utvrđeni su granični nivoi toksičnosti. Kritičan toksični efekat SFN je smanjenje procenta neutrofila, a PA-MSHA povećanje koncentracije transformišućeg faktora beta kod mužjaka pacova. Rezultati ispitivanja pokazuju da kombinacija SFN i PA-MSHA uglavnom izaziva efekte kao i pojedinačna primena PA-MSHA. Rezultati ove doktorske disertacije razjašnjavaju mehanizme toksičnosti pojedinačne i kombinovane primene ispitivanih imunomodulatora, dok utvrđene vrednosti graničnih nivoa toksičnosti za pojedinačne imunomodulatore mogu biti osnova za dalji odabir doza pri njihovoj kombinovanoj primeni.

Ključne reči: imunomodulatori, sulforafan, *Pseudomonas aeruginosa* sa hemaglutininskim fimbrijama osetljivim na manozu, *in silico*, *in vitro*, pacov, zebrica, kombinovana primena

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Toksikologija

In silico, in vitro and in vivo investigation of the toxicity of the combined application of the immunomodulator sulforaphane and inactivated bacteria *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract

In this dissertation, the toxicity of immunomodulators with antitumor potential, chemically derived sulforaphane (SFN) and a *Pseudomonas aeruginosa* strain with mannose-sensitive hemagglutinin fimbriae (PA-MSHA) was comprehensively investigated. *In silico* analysis showed that SFN can cause chromosomal damage and skin sensitization by affecting genes involved in the processes of immune response, oxidative status and apoptosis, while PA-MSHA interacts with genes involved in the process of immune system regulation and apoptosis. Under *in vitro* conditions, SFN exerts a cytotoxic effect on colon cancer cells, especially on HCT-116 compared to HT-29 cells, by killing cells in the G2/M phase of the cell cycle. A similar cytotoxic potential of the combined use of immunomodulators was observed, but it leads to the death of fewer colon cancer cells than SFN alone. In an *in vivo* test in a zebrafish model, lethal concentrations for SFN and PA-MSHA and thresholds for toxicity were determined to monitor the effects on growth and development of zebrafish embryos. The combined administration of SFN and PA-MSHA results in adverse effects on zebrafish embryos at concentrations at which the individual substances showed no adverse effects. In *in vivo* studies in a rat model, changes in hematological and biochemical parameters, hormone levels, production of cytokines and other proteins, oxidative status parameters and pathohistological changes were observed, with pro- and anti-inflammatory cytokines and oxidative stress parameters being the most sensitive to the effects of immunomodulators. In addition, dose-dependent changes in a number of monitored effects were observed following the administration of individual immunomodulators and thresholds for toxicity were determined. A critical toxic effect of SFN is a decrease in the percentage of neutrophils and of PA-MSHA an increase in the concentration of transforming factor beta in male rats. The test results show that the combination of SFN and PA-MSHA generally has the same effects as the use of PA-MSHA alone. The results of this dissertation clarify the mechanisms of toxicity of the single and combined application of the tested immunomodulators, while the determined thresholds of toxicity of the single immunomodulators can be the basis for further selection of doses for their combined application.

Keywords: immunomodulator, sulforaphane, inactivated bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *in silico*, *in vivo*, rat, zebrafish, combined application

Academic expertise: Pharmacy

Major in: Toxicology

SPISAK SKRAĆENICA

AKT1 - AKT serin/treonin kinaza 1
ALT - Alanin aminotransferaza
ALP - Alkalna fosfataza
AST - Aspartat aminotransferaza
AP-1 - Aaktivator proteina 1
AURKA - Aurora kinaza A
BAD - Bcl-2 povezan agonista proteina ćelijske smrti
BAX - Regulator apoptoze BAX
BMD - *Benchmark* doza (doza dobijena *Benchmark* modelovanjem)
CASP3 - Kaspaza 3
CASP8 - Kaspaza 8
CCL2 - Hemokin ligand 2
CD14 - CD14 antigen
CDH1 - Kadherin 1
CDK1 - Ciklin-zavisna kinaza 1
CDKN1A - Inhibitor ciklin-zavisne kinaze 1A
CTLA-4 - Citotoksični T-limfociti pridružen protein 4
COX-2 - Ciklooksigenaza-2
CXCL1 – Hemokin C-X-C motiv ligand 1
DEG - Različito eksprimirani geni (engl. *Differentially expressed genes*)
DTNB - 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina
GCL - Glutamat-cistein ligaza
GSH - Glutation
GST - Glutation-S-transferaza
HDL - Lipoprotein visoke gustine
HMOX1 - Hem oksigenaza 1 (gen)
hpf - Sati nakon oplodjenja
HO-1 - Hem oksigenaza 1
ICI - Inhibitori imunskih polaznih tačaka
IL-1B - Interleukin 1B (gen)
IL-1β - Interleukin 1 beta
IL-2 - Interleukin 2
IL-4 - Interleukin 4
IL-6 - Interleukin 6
IL-10 - Interleukin 10
IFNG - Interferon gama (gen)
IFNγ - Interferon gama
iNOS - Inducibilna sintaza azot-monoksida
JNK - c-Jun N-terminalna kinaza
Keap1 - *Kelch-like ECH* pridruženi protein (engl. *Kelch-like ECH-associated protein 1*)
LAG-3 - Gen 3 za aktivaciju limfocita
LDL - Lipoprotein niske gustine
MDA - Malondialdehid
NF-kB - Nuklearni faktor-kapa B
Nrf2 - Nuklearni eritroidni faktor-2
NO - Azot-monoksid
NQO1 - NAD(P)H kinon oksidoreduktaza-1
PA-MSHA - *Pseudomonas aeruginosa* sa eksprimiranim manozom osjetljivim hemaglutininskim fimbrijama (engl. *Pseudomonas aeruginosa mannose-sensitive-hemagglutinin*) ili inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

PARP – poli ADP-riboza polimeraza
PD-1 - Programirani protein smrti ćelije 1
PD-L1 - Ligand programiranog proteina smrti ćelije 1
PGE2 - Prostaglandin E2
PLAC8 - Protein specifičan za placenta 8
RUNX2 - Transkripcioni factor 2 povezan sa Runtom
SFN - Sulforafan
SFX-01 - Specifičan eksperimentalni molekul (SFX-01)
SH - Sulfhidrilne grupe
SOD - Superoksid dismutaza
TIBC - Totalni kapacitet vezivanja gvožđa
TLR4 - *Toll-like* receptor 4
TLR6 - *Toll-like* receptor 6
TNF - Tumor nekrozni faktor
TGFβ - Transformišući faktor rasta beta
TNFα - Tumor nekrozni faktor alfa
UGT - UDP-glukuronoziltransferaza
UIBC - Nezasićeni (slobodni) kapacitet vezivanja gvožđa

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Sulforafan	1
1.1.1. Poreklo, struktura i mehanizam dejstva	1
1.1.2. Pozitivni efekti primene sulforafana: <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> i kliničke studije	2
1.1.2.1. Antitumorski potencijal	2
1.1.2.2. Antidiabetogeno dejstvo	4
1.1.2.3. Kardioprotektivno dejstvo	4
1.1.2.4. Neuroprotektivno dejstvo	5
1.1.3. Toksičnost	6
1.2. Inaktivisana bakterija <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.2.1. Način dobijanja i primena	7
1.2.2. Antitumorski potencijal	8
1.2.2.1. <i>In vitro</i> studije	8
1.2.2.2. <i>In vivo</i> studije	9
1.2.2.3. Kliničke studije	10
1.2.3. Toksičnost	11
1.3. Kombinovana primena imunomodulatora	12
1.4. Ispitivanje toksičnosti	12
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	13
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. <i>In silico</i> ispitivanje	15
3.1.1. Analiza odnosa strukture i dejstva	15
3.1.2. Toksikogenomička analiza podataka	15
3.1.3. Predviđanje toksičnosti na nivou gena	17
3.2. Hemikalije i inaktivisana bakterija <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
3.3. <i>In vitro</i> ispitivanje	18
3.3.1. Čelijske linije	18
3.3.2. Citotoksičnost	18
3.3.3. Proapoptotski potencijal	18
3.3.4. Distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa	19
3.3.5. Promena mitohondrijskog membranskog potencijala	19
3.3.6. Merenje nivoa slobodnih radikala	19
3.3.7. Pripremanje ćelijskog lizata za <i>Western blot</i> analizu	20
3.4. <i>In vivo</i> ispitivanje na modelu zebrice	20
3.4.1. Zebrice	20
3.4.2. Eksperimentalni protokol	21
3.4.3. Ispitivanje toksičnosti	21
3.4.4. Modelovanje odnosa koncentracija-odgovor	22
3.5. <i>In vivo</i> ispitivanje na modelu pacova	23
3.5.1. Eksperimentalne životinje i dizajn eksperimenta	23
3.5.2. Unos vode i hrane	24
3.5.3. Prirast telesne mase i relativna masa organa	24
3.5.4. Uzorci i priprema za analizu	25
3.5.5. Određivanje hematoloških parametara	25
3.5.6. Određivanje biohemijskih parametara	25
3.5.7. Određivanje nivoa hormona	26

3.5.8. Analiza produkcije proteina.....	26
3.5.9. Određivanje parametara oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite	26
3.5.10. Patohistološka analiza tkiva.....	27
3.5.11. Modelovanje odnosa doza-odgovor.....	28
3.5.12. Statistička obrada podataka	28
4. REZULTATI.....	29
4.1. In silico analiza.....	29
4.1.1. Predviđanje toksičnosti sulforafana	29
4.1.2. Toksikogenomička analiza sulforafana	29
4.1.3. Genska ontologija sulforafan-intereagujućih gena	32
4.1.4. Uticaj sulforafana na imunski sistem.....	34
4.1.5. Predviđanje toksičnih efekata sulforafana na nivou gena.....	35
4.1.6. Toksikogenomička analiza inaktivisane bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
4.1.7. Genska ontologija inaktivisana bakterija <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -intereagujućih gena	38
4.2. Ispitivanje citotoksičnog potencijala u in vitro uslovima	41
4.2.1. Citotoksičnost	41
4.2.2. Proapoptotski potencijal	45
4.2.3. Uticaj na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa.....	46
4.2.4. Uticaj na promenu mitohondrijskog membranskog potencijala	48
4.2.5. Uticaj na produkciju slobodnih radikala	48
4.2.6. Uticaj na proteinsku ekspersiju.....	49
4.3. In vivo analiza.....	50
4.3.1. Rezultati na modelu zebrice.....	50
4.3.1.1. Sulforafan.....	50
4.3.1.2. Inaktivisana bakterija <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51
4.3.1.3. Kombinovana primena imunomodulatora	53
4.3.2. Rezultati na modelu pacova	55
4.3.2.1. Uticaj na unos vode i hrane.....	55
4.3.2.1.1. Sulforafan.....	55
4.3.2.1.2. Inaktivisana bakterija <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
4.3.2.1.3. Kombinovana primena imunomodulatora	62
4.3.2.2. Uticaj na prirast telesne mase	65
4.3.2.2.1. Sulforafan.....	65
4.3.2.2.2. Inaktivisana bakterija <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66
4.3.2.2.3. Kombinovana primena imunomodulatora	67
4.3.2.3. Uticaj na relativnu masu organa	68
4.3.2.3.1. Sulforafan.....	68
4.3.2.3.2. Inaktivisana bakterija <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69
4.3.2.3.3. Kombinovana primena imunomodulatora	70
4.3.2.4. Uticaj na hematološke parametre.....	72
4.3.2.4.1. Sulforafan.....	72
4.3.2.4.2. Inaktivisana bakterija <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75
4.3.2.4.3. Kombinovana primena imunomodulatora	78
4.3.2.5. Uticaj na biohemijske parametre	80
4.3.2.5.1. Sulforafan.....	80
4.3.2.5.2. Inaktivisana bakterija <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	83
4.3.2.5.3. Kombinovana primena imunomodulatora	86

4.3.2.6. Uticaj na nivoe hormona.....	88
4.3.2.6.1. Sulforafan.....	88
4.3.2.6.2. Inaktivisana bakterija <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	90
4.3.2.6.3. Kombinovana primena imunomoduatora	91
4.3.2.7. Uticaj na produkciju proteina	92
4.3.2.7.1. Sulforafan.....	92
4.3.2.7.2. Inaktivisana bakterija <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	95
4.3.2.7.3. Kombinovana primena imunomodulatora	98
4.3.2.8. Uticaj na parametre oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite	99
4.3.2.8.1. Sulforafan.....	99
4.3.2.8.2. Inaktivisana bakterija <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	105
4.3.2.8.3. Kombinovana primena imunomodulatora	110
4.3.2.9. Kritični toksični efekti	114
4.3.2.10. Patohistološka analiza tkiva.....	114
4.3.2.10.1. Jetra.....	114
4.3.2.10.2. Slezina.....	121
5. DISKUSIJA	128
5.1. Toksičnost sulforafana	128
5.1.1. <i>In silico</i> analiza	128
5.1.2. <i>In vitro</i> analiza	132
5.1.3. <i>In vivo</i> analiza	133
5.1.3.1. Akutna toksičnost sulforafana na modelu zebrice	133
5.1.3.2. Subakutna toksičnost na modelu pacova	134
5.2. Toksičnost inaktivisane bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	139
5.2.1. <i>In silico</i> analiza	139
5.2.2. <i>In vitro</i> analiza	139
5.2.3. <i>In vivo</i> analiza	140
5.2.3.1. Akutna toksičnost na modelu zebrice	140
5.2.3.2. Subakutna toksičnost na modelu pacova	140
5.3. Toksičnost kombinovane primene sulforafana i inaktivisane bakterije	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	144
5.3.1. <i>In silico</i> analiza	144
5.3.2. <i>In vitro</i> analiza	145
5.3.3. <i>In vivo</i> analiza	145
5.3.3.1. Akutna toksičnost na modelu zebrice	145
5.3.3.2. Subakutna toksičnost na modelu pacova	146
5.4. Kritični toksični efekti.....	148
6. ZAKLJUČCI.....	150
7. LITERATURA.....	152
8. PRILOZI.....	168
8.1. Prilog 1 - Dodatni rezultati	168
8.2. Prilog 2 - Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije....	173
9. BIOGRAFIJA AUTORA	176
10. IZJAVE AUTORA DOKTORSKE DISERTACIJE.....	177

1. UVOD

Širom sveta incidenca malignih bolesti je u stalnom porastu. Procene Svetske zdravstvene organizacije (SZO) ukazuju da će u narednim godinama karcinom postati vodeći uzrok smrti (1). Najčešći tip karcinoma, koji je ujedno praćen i najvećom stopom smrtnosti je karcinom pluća. Posmatrano prema polu, karcinom dojke je najčešći među ženama, dok je kod muškaraca najveća učestalost karcinoma pluća, zatim karcinoma prostate i kolorektalnog karcinoma (2). Ovo ukazuje da su neophodne bolje mere prevencije, dijagnostike, kao i lečenja (3). Poslednje dve decenije u oblasti terapije karcinoma obeležene su značajnim napretkom, posebno uvođenjem nove klase imunomodulatornih lekova koji se označavaju kao inhibitori kontrolnih tačaka (engl. *Immune Checkpoint Inhibitors*, ICI). Ciljne molekule delovanja ICI (koji se primenjuju u formi monoklonskih antitela) su inhibitorni receptori najčešće ispoljeni na T limfocitima (citotoksičnim T-limfocitima pridružen protein 4, (CTLA-4), programirani protein smrti ćelije 1 (PD-1), gen 3 za aktivaciju limfocita (LAG-3)) i njihovi ligandi (npr. ligand programiranog proteina smrti ćelije 1 (PD-L1)) ekspimirani na ćelijama solidnih tumora. Primenom ICI stimuliše se imunski sistem i pojačava antitumorski imunski odgovor (4). Osim monoklonskih antitela, razvijeni su i drugi vidovi imunoterapije, kao što su adaptivna ćelijska terapija antitumorskim T ćelijama (autologe tumor-specifične T ćelije i T ćelije sa himeričnim antigenskim receptorom, CAR-T ćelije) i vakcinacija tumorskim antigenima (5). Posebno se ističe značaj primene terapije sa ciljem da se poboljša imunski odgovor obolelih od malignih tumora budući da je značajno oslabljen usled hronične aktivacije tumorskim neoantigenima, kao i zbog primene hemio i/ili radioterapije (6). Narušena funkcija imunskog odgovora domaćina može olakšati rast i progresiju tumora, ali i uticati na efikasnost primenjene imunoterapije. Stoga, opravdano je pretpostaviti da imunomodulatori mogu da doprinesu regulisanju funkcionisanja imunskog odgovora kod pacijenata obolelih od malignih tumora. Literaturni podaci pokazuju da brojna prirodna jedinjenja izolovana iz biljaka, morskih organizama i mikroorganizama ispoljavaju imunomodularnu aktivnost delujući antiinflamatorno, utičući na proces angiogeneze i apoptoze, kao i ispoljavajući antioksidativne aktivnosti. Među njima su ispitivani rezveratrol, kurkumin, ginseng (7, 8), ali i sulforafan (SFN) (9). Za bakterije je takođe poznato da ispoljavaju antitumorsku aktivnost i to direktnim tumoricidnim efektom ili indirektno, aktivacijom imunskog sistema, poput inaktivisane i genetski modifikovane gram negativne bakterije *Pseudomonas aeruginosa* koja eksprimira fimbrije sa hemaglutininom osetljivim na manozu (PA-MSHA) (10). Sulforafan i PA-MSHA su imunomodulatori koji su predmet istraživanja ove doktorske disertacije.

1.1. Sulforafan

1.1.1. Poreklo, struktura i mehanizam dejstva

Izotiocijanati su dominantno zastupljeni u povrću iz porodice krstašica, *Brassicaceae* (brokoli, karfiol, kelj, kupus i drugi), a određene epidemiološke i kliničke studije pokazuju da povećan unos ovog povrća može imati povoljan uticaj na organizam i smanjiti mogućnost za razvoj brojnih bolesti (11). Izotiocijanati su proizvodi hidrolize glukozinolata, sekundarnih metabolita biljaka, koji postaju biološki aktivni nakon hidrolize. Hidrolitičku reakciju katalizuje enzim endogena mirozinaza (β -tioglukozidaza) ili humana gastro-intestinalna mikrobiota (12-14). Jedan od najpoznatijih predstavnika ove grupe je SFN, hemijski 1-izotiocianato-4-(metilsulfinil) butan. Biljke iz porodice *Brassicaceae* sadrže glukorafanin, koji u procesu hidrolize prelazi u SFN (aglikonski deo ovog glukozinolata). Proces pretvaranja glukorafanina u SFN je odbrambeni mehanizam

biljke i aktivira se kada je biljka izložena oštećenju na bilo koji način (patogeni organizmi i infekcije, mehaničko oštećenje kao što su seckanje, žvakanje, itd). Prilikom oštećenja, oslobađa se mirozinaza, enzim koji katalizuje pomenuti hidrolitički proces (15, 16).

SFN se metaboliše kroz merkaptorni put. Prva faza metabolizma uključuje interakciju reaktivnog elektrofilnog ugljenika iz funkcionalne grupe izotiocijanata ($-N=C-S$) i glutationa (GSH) uz pomoć glutation S-transferaze. Dobijeni kompleks SFN-GSH se dalje metaboliše enzimima c-glutamyltranspeptidaza, cisteinilglicinaza i N-acetiltransferaza, do konačnog i glavnog metabolita koji se izlučuje urinom, SFN-N-acetilcistein (13, 15). SFN ima brojne pozitivne efekte na organizam. Na primer, pokazuje antiinflamatorne i antioksidativne karakteristike, kao i potencijal za primenu u terapiji tumora, dijabetesa, kardiovaskularnih i drugih bolesti u obliku ekstrakta iz semena brokolija standardizovanog na SFN (17-19). Na tržištu Srbije, dostupan je u Ge132+® preparatu (Alpha Caps GmbH, Nemačka), preparatu Sulforaphan® (Swanson, Sjedinjenje Američke Države, SAD), kao i preparatu Bestin® (GEFA Laboratorija, Francuska). Funkcionalna grupa izotiocijanata u molekulu SFN smatra se ključnom farmakoforom putem koje SFN ostvaruje brojne pozitivne efekte na ljudsko zdravlje (20).

Jedan od glavnih mehanizama kojim SFN ostvaruje zaštitne efekte je aktivacija transkripcionog faktora, nuklearnog eritroidnog faktora-2 (Nrf2) (21, 22) inhibicijom bZIP proteina. SFN reaguje sa tio grupama bZIP proteina stvarajući tionoacil produkte, koji reaguju sa cisteinskim ostacima Keap1 proteina (engl. *Kelch-like ECH-associated protein 1*) i time sprečavaju poliubikvitinaciju i razgradnju Nrf2 što dovodi do Nrf2-Keap1-ARE signalizacije i nukleocitoplazmatske redistribucije Nrf2 (23). Nrf2 ima važnu antiinflamatornu funkciju u brojnim tkivima aktiviranjem enzima II faze metabolizma i inhibicijom signalnog puta nuklearnog faktora-kapa B (NF- κ B) (22). Stimulacija Nrf2 od strane SFN dovodi do pojačane ekspresije gena koji kodiraju enzime, kao što su: NAD(P)H hinon oksidoreduktaza-1 (NQO1), hem oksigenaza 1 (HO-1), katalaza, glutamat-cistein ligaza (GCL), glutation-S-transferaza (GST), UDP-glukuronoziltransferaza (UGT), epoksid hidrolaza i superoksid dismutaza (SOD) koji imaju važnu ulogu u prevenciji oksidativnog stresa u organizmu (24). Modulacijom Nrf2 molekularnog puta, i posledičnom aktivacijom gena uključenih u procese antioksidativne zaštite, antiinflamatorne puteve i apoptozu, SFN ostvaruje niz korisnih efekata u prevenciji brojnih patoloških stanja (25).

1.1.2. Pozitivni efekti primene sulforafana: *in vitro*, *in vivo* i kliničke studije

Brojna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja, kao i kliničke studije su sprovedene sa ciljem da se utvrde pozitivni efekti SFN. U *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima SFN je primenjivan kao biljni ekstrakt ili supstanca dobijena hemijskom sintezom, dok se u kliničkim ispitivanjima SFN isključivo primenjuje u vidu standardizovanog ekstrakta dobijenog iz semena brokolija (<https://www.clinicaltrials.gov/>). Nadalje će biti predstavljeni najznačajniji dostupni literaturni podaci o pozitivnim efektima SFN dobijeni u različitim vrstama ispitivanja.

1.1.2.1. Antitumorski potencijal

Sprovedene *in vitro* studije ukazale su na potencijal SFN u prevenciji i lečenju bolesti poput karcinoma pankreasa, dojke, limfoma, hepatocelularnog karcinoma, leukemije i karcinoma prostate (26). U jednoj od studija, utvrđeno je da SFN obnavlja gubitak međućelijske komunikacije/signalizacije kroz povećanje ekspresije koneksina 43 što dovodi do senzibilizacije rezistentnih ćelija tumora na primenjenu terapiju (27).

Antiproliferativni efekti SFN na ćelijama primarnog efuzionog limfoma posredovani su stimulacijom apoptotske ćelijske smrti kroz aktivaciju kaspaza. Dodatno, u ovim ćelijama, SFN inhibira fosforilaciju p38MAPK i AKT (28). Takođe, *in vitro* studije ukazuju na potencijal SFN za primenu uz antitumorske lekove i hemioterapiju uopšte. Na primer, kod ćelija malignih tumora uočena je niska hemiosenzitivnost na cisplatin i pojava brojnih sistemskih neželjenih efekata usled subdoziranja cisplatina, deaktivacije cisplatina od strane jedinjenja koje sadrže sumpor, kao i zbog nespecifične distribucije ćelija tumora po fazama ćelijskog ciklusa, što značajno ograničava primenu cisplatina u terapiji malignih tumora. Međutim, kombinovana primena cisplatina i SFN, dovela je do značajnog smanjenja nivoa glutationa (GSH), parametra oksidativne zaštite, u ćelijama tumora dojke i posledično, stimulacije apoptoze izazvane oštećenjem DNK (29). Efekti SFN takođe su ispitani na matičnim leukemijskim ćelijama (LSC) otpornim na imatinib (IM). Kombinovani tretman IM i SFN povećao je osetljivost CD34⁺/CD38⁻ LSC ćelija i indukovao apoptozu, povišenom ekspresijom kaspaze 3, PARP (poli ADP-riboza polimeraza 1) i BAX gena koji kodira Bax protein (Bcl-2 pridruženi X antigen), i smanjenom ekspresijom Bcl-2 (B-ćelijski limfom 2). Mehanizam kojim je kombinovani tretman IM i SFN povećao osetljivost LSC ćelija uključuje i indukciju intraćelijskih reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS). LSC ćelije pokazale su smanjen nivo ekspresije glutation-S-transferaze pi 1 (GSTP1) i intraćelijskog GSH, što je povećalo osetljivost na IM i SFN (30). Slično tome, SFN i kapsaicin, jedinjenje izolovano iz ljutih papričica, dovode do smanjenja broja nuklearnih androgenih receptora, specifičnog antigena prostate, i nivoa Bcl-XL, kao i do inhibicije proliferacije ćelija izazvanu androgenom i Tip60 u humanoј LNCaP ćelijskoј liniji poreklom iz metastatskog karcinoma prostate. Takođe, ova bioaktivna jedinjenja sprečavaju povećanje glikolize, aktivnost heksokinaze i piruvat kinaze, i smanjuju stabilnost i aktivnost HIF-1 α izazvanu androgenom i Tip60 u LNCaP ćelijama (31).

Prikazani *in vitro* rezultati podržani su sprovedenim *in vivo* studijama koje su potvrdile antitumorski potencijal SFN kod tumora dojke, kolona, jednjaka, kože, itd. (32). Castro i sar. (2019) pokazali su da SFN inhibira proliferaciju i diferencijaciju matičnih ćelija odgovornih za razvoj rezistencije na hemioterapiju i radioterapiju na eksperimentalnom modelu miševa kod kojih su injektovane ćelije trostruko negativnog karcinoma dojke (33). Pored toga, Tsubura i sar. (2011) demonstrirali su efikasnost SFN u lečenju tumora dojke na animalnom modelu miševa postižući dozno-zavisnu inhibiciju proliferacije i indukciju apoptoze tumorskih ćelija KLP-1, kao i smanjenje broja metastaza u limfnim čvorovima (34). Antitumorski efekat SFN u terapiji tumora jednjaka kod pacova, postignut je inhibicijom proliferacije tumorskih ćelija i stimulacijom apoptoze posredovane kaspazama, kao i inhibicijom autofagije putem aktivacije Nrf2. Međutim, u niskim dozama (5 mg/kg t.m./dan) SFN je indukovao autofagiju u ćelijama tumora, odnosno metabolički proces koji omogućava ćelijama karcinoma da se prilagode metaboličkom stresu i uslovima nepovoljnim za rast i razvoj, čime je dalje stimulirano preživljavanje tumorskih ćelija (35). Takođe, pokazano je da SFN deluje na ćelije tumora pankreasa, inhibirajući njihov rast i, posledično, smanjujući progresiju tumora i povećavajući stopu preživljavanja BALB/c miševa (transgeničnih miševa sa adenokarcinomom pankreasa) tretiranih SFN tokom 120 dana (36). Međutim, iako je antitumorska aktivnost SFN do sada pokazana u brojnim istraživanjima, u studiji sprovedenoj od strane Rai i sar. (2020) pojedinačna primena SFN nije dala očekivane rezultate, već je značajno smanjenje veličine tumora bez ispoljavanja toksičnih efekata uočeno tek pri kombinovanoj primeni paklitaksela i SFN. Ovo ukazuje na protektivan potencijal SFN kada se primenjuje kao dodatak hemioterapeutima, smanjujući pojavu štetnih efekata (37). Pored studija sprovedenih na animalnom modelu miša, antitumorski potencijal SFN uočen je i na ksenograft modelu zebrice (*Danio rerio*)

pri čemu je pokazana efikasnost SFN u smanjenju rasta glioblastoma, adenokarcinoma dojke i cervikalnih tumora (38).

Neki od predloženih antitumorskih mehanizama SFN su inhibicija ćelijskog ciklusa u G1 i u G2/M fazi (39). Indukcija apoptoze takođe je istaknuta kao važan mehanizam, pri čemu je utvrđeno da SFN deluje na mitohondrijski (unutrašnji) i receptorski (spoljašnji) put apoptoze (39, 40). Pored toga, SFN aktivira mitogenom aktivirane proteinske kinaze (MAPK), fosfatidilinozitol 3-kinazu (PI3K) i proteinsku kinazu C (PKC), kao i posledično signalne puteve regulisane pomenutim kinazama. Indukcija ovih signalnih puteva dovodi se u vezu sa antitumorskim svojstvima SFN (14). SFN takođe inhibira histon deacetilaze (HDAC) i topoisomerase I i II, koje igraju ključne uloge u replikaciji DNK molekula (40). SFN pokazuje i snažne antioksidativne karakteristike, odnosno neutrališe i vezuje slobodne radikale kao što su superoksidni, peroksidni i hidroksilni radikali (21). Eliminacijom slobodnih radikala i oskidanata SFN štiti organizam od oksidativnog stresa, inflamacije, ali i karcinogena (23).

1.1.2.2. Antidijabetogeno dejstvo

Brojna istraživanja pokazala su da se SFN može koristiti i u prevenciji i lečenju metaboličkih bolesti, među kojima je i dijabetes.

SFN je pokazao pozitivne antidijabetogene efekte povećavajući efikasnost apsorpcije glukoze i poboljšavajući osetljivost HepG2 ćelija na insulin. Kao što je već rečeno, SFN dovodi do povećanja ekspresije antioksidativnih gena regulisanih aktivnošću Nrf2 i do smanjenja nakupljanja lipidnih peroksida, MDA i 4-HNE, čime je insulinska rezistencija izazvana ishranom bogatom mastima redukovana (41). Axelsson i sar. (2017) pokazali su antidijabetogeno dejstvo SFN *in vivo*, na miševima i pacovima. Tretman miševa i pacova različitim dozama SFN doveo je do smanjenja proizvodnje glukoze usled translokacije Nrf2 i inhibicije enzima uključenih u proces glukoneogeneze, a potom je ovaj efekat potvrđen i u studiji kod ljudi. U sprovedenom istraživanju antidijabetogeni efekat SFN upoređen je sa metforminom, lekom prvog izbora za lečenje dijabetesa tipa II, pri čemu nije uočena značajna razlika u efikasnosti, iako je postignut efekat bio rezultat različitog mehanizma delovanja (42). Pored potencijala u lečenju dijabetesa, istraživanja pokazuju da SFN može prevenirati i razvoj makrovaskularnih komplikacija dijabetesa. Zaštita od razvoja retinopatije, nefropatije i kardiovaskularnih bolesti ogleda se u aktivaciji Nrf2, što doprinosi povećanju antioksidativnog kapaciteta somatskih ćelija usled pojačane sinteze HO1, NQO1, GSH, SOD i KAT (43-45). Osim toga, SFN smanjuje nivo proinflamatornih citokina (TNF α , IL-1b, IL-6) što doprinosi prevenciji dijabetičke retinopatije (44). Aktivacija Nrf2 signalnog puta indukuje apoptozu i ferroptozu, sprečavajući tako napredovanje dijabetičke kardiomiopatije (45). Na isti način, SFN ostvaruje i zaštitni efekat na bubrege sprečavajući razvoj nefropatije (43).

1.1.2.3. Kardioprotektivno dejstvo

U brojnim *in vitro* i *in vivo* istraživanjima primećeno je da korišćenje fitohemikalija poput SFN može imati značajnu ulogu u prevenciji kardiovaskularnih bolesti. Poletto Bonetto i sar. (2022) pokazali su da SFN ostvaruje kardioprotektivan efekat smanjenjem ekspresije rianodinskog receptora (Ryr), što dovodi do modulacije kontrakcije miokarda i boljeg iskorišćavanja kalcijuma kod pacova sa srčanom ishemijom (46). Jayakumar i sar. (2013) ukazali su na profilaktički potencijal SFN u akutnoj plućnoj tromboemboliji *in vivo*, na modelu miševa. SFN je delovao protektivno aktiviranjem adenilat ciklaze, što je rezultiralo povećanjem nivoa cAMP (ciklični adenozin monofosfat) i naknadnom inhibicijom

signalnih puteva uključenih u procese agregacije trombocita što je potvrđeno u *ex vivo* studiji (47). U istraživanju sprovedenom od strane Zhang i sar. (2022), SFN je poboljšao srčanu funkciju i preživljavanje kardiomiocita kod miševa sa indukovanom srčanom ishemijom. Kardioprotektivni efekat postignut je inhibicijom ekspresije CAMK2D gena odgovornog za sintezu CaMKII δ proteina (kalcijum/kalmodulin zavisna proteinska kinaza II), čija smanjena aktivnost štiti srce od ishemijskih događaja. Takođe, kod SFN tretiranih životinja uočena je indukcija gena koji kodira CaMKIIN2 (kalcijum/kalmodulin zavisna proteinska kinaza II N2) protein, a čija je uloga dalja inhibicija CaMKII δ (48).

Dodatno, SFN ostvaruje kardioprotektivna dejstva, prevenirajući hipertenziju, ateroskleroza i poremećaje na nivou ishemijsko-reperfuzione mikrocirkulacije (I/R) (13) što je pokazano u *in vitro* i *in vivo* studijama, a neophodno je dalje potvrditi kod ljudi kroz kliničke studije. Mehanistički, aktivacija signalnog puta Nrf2 i posledično suprimiranje inflamacije i modulacija metabolizma lipida igraju ključnu ulogu u SFN-posredovanoj zaštiti kardiovaskularnog sistema (48). Ovaj izotiocijanat povećava lipolizu i sprečava diferencijaciju adipocita, pri čemu inhibira ekspresiju transkripcionih faktora PPAR γ (receptor aktiviran proliferatorom peroksizoma gama) i C/EBP α (protein koji se vezuje za pojačivač CCAAT), uključenih u regulaciju diferencijacije adipocita i akumulacije masti, zahvaljujući čemu je inhibicija sinteze triacilglicerida smanjena, a time i mogućnost formiranja aterosklerotskih plakova (49, 50). Dodatno, dejstvom na lipolizu i sprečavanjem akumulacije masti, SFN ostvaruje pozitivne metaboličke efekte, i posledično kako antidijabetogeno, tako i kardioprotektivno dejstvo. Mehanistički, SFN aktivira hormonsenzitivnu lipazu i stimuliše diferencijaciju belih adipocita u smeđe masno tkivo. Rezultati sugerišu da SFN može izazvati lipofagiju putem AMPK-mTOR-ULK1 signalnog puta, što dovodi do parcijalne lipolize adipocita (51), čime je kardiovaskularni sistem zaštićen od razvoja dijabetičke kardiomiopatije (52).

1.1.2.4. Neuroprotektivno dejstvo

Neuroprotektivno dejstvo SFN uočeno u *in vitro*, *in vivo* i kliničkim studijama ukazuje na mogući terapijski potencijal SFN u lečenju neurodegenerativnih bolesti kao što su Alchajmerova i Parkinsonova bolest (53).

Bahn i sar. (2019) ispitivali su vezu između Nrf2 i Alchajmerove bolesti, *in vitro* i *in vivo*, pri čemu su humane ćelije neuroblastoma, SH-SY5Y, tretirane sa 1 μ M SFN. U tretiranim ćelijskim kulturama, SFN je doveo do hiperprodukcije Nrf2 i smanjenja transkripcije memapsin 2 enzima (BACE1) i BACE1-AS transkripta, koji su uključeni u procese amiloidogeneze (54). S druge strane, Zhang i sar. (2015) ukazali su na mogućnost korišćenja SFN u terapiji Alchajmerove bolesti, korišćenjem animalnog modela. Miševi oboleli od Alchajmerove bolesti tretirani su SFN pri čemu je pokazan neuroprotektivni efekat ovog imunomodulatora. Oni su utvrdili da SFN štiti mozak od taloženja amiloida β (A β), odgovornog za degeneraciju neurona i sinapsi, obnavlja endogene antioksidanse u mozgu i reguliše aktivnost glutathion peroksidaze (GPX) koja je smanjena u Alchajmerovoj bolesti. U ovoj studiji je takođe, uočen anksiolitički potencijal SFN, budući da je doprineo povećanju aktivnosti obolelih miševa (55). Pored toga, SFN poboljšava kogniciju kod miševa sa Alchajmerovom bolesti, te smanjuje nivo A β -oligomera, kada se primeni u fazi bolesti u kojoj je funkcija nerava minimalno oštećena, tj. na početku atipične formacije A β -oligomera, što je potvrđeno i u *in vitro* studiji (56). Pretpostavljeni mehanizam kojim SFN dovodi do poboljšanja kognicije jeste aktiviranje Nrf2, i posledično povećanje antioksidativne zaštite, kao i smanjenje A β proteina i fosforilacije tau proteina u hipokampusu (57). Mogućnost korišćenja SFN u Alchajmerovoj bolesti prikazana je i u kliničkoj studiji koju su sprovedli Lee i sar. (2023). Prilikom oralne primene SFN u

dnevnim dozama od 10 do 50 mg/kg uočeno je smanjeno oštećenje pamćenja karakteristično za Alchajmerovu bolest, kao i niži nivoi tau proteina, fosforiliranog tau proteina i A β proteina, glavnih patofizioloških faktora ove bolesti. SFN inhibira njihovu sintezu i stimuliše degradaciju kroz povećanje aktivnosti proteina toplotnog šoka 70, HSP70, i intereagujućeg proteina C-terminusa HSP70 (59).

SFN pokazuje terapijski potencijal i kod Parkinsonove bolesti. Njegova primena sprečila je degeneraciju dopaminergičkih neurona, što je rezultiralo poboljšanjem oštećene motoričke funkcije, koordinacije i ravnoteže. Ovaj efekat postignut je povećanjem antioksidativnog potencijala u substanciji nigri i inhibicijom apoptoze nervnih ćelija (58-60). Inhibicija apoptoze postignuta je smanjenjem fragmentacije DNK i aktivnosti kaspaze-3 (59), dok je poboljšanje antioksidativne zaštite u mozgu ostvareno aktiviranjem Nrf2 i povećanjem transkripcije i sinteze antioksidativnih enzima HO-1 i NQO1, kao i uticajem na metabolizam glutationa (59, 60). Drugim rečima, u slučaju Parkinsonove bolesti, SFN ostvaruje zaštitni efekat smanjenjem oksidativnog stresa u nervnim ćelijama, i to putem regulacije Nrf2-ARE puta koji dovodi do reverzibilnog povećanja ekspresije antioksidativnih enzima HO-1 i NQO-1 (61).

Yoo i sar. (2019) i Li i sar. (2013) sprovedi su studije na miševima kojima je indukovano eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis pri čemu je uočena mogućnost korišćenja SFN kao adjuvantne terapije za multiplu sklerozu. Antioksidativni i antiinflamatorni potencijal SFN može biti od značaja u terapiji budući da je multipla skleroza praćena imunski-posredovanom demijelinizacijom neurona u mozgu, kičmenoj moždini i optičkom nervu. Antioksidativni efekat postiže se, ponovo, aktivacijom Nrf2 i posledičnim povećanjem sinteze i aktivnosti antioksidativnih enzima. Pored toga, SFN smanjuje broj antigen specifičnih Th17 ćelija, ključnih za razvoj autoimunske encefalopatije. Takođe, SFN poboljšava integritet krvno-moždane barijere inhibiranjem oksidativnog stresa, smanjenjem ekspresije matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9), čime su nivoi proteina kladudin-5 i okcludin koji igraju jednu od ključnih uloga za održavanje integriteta krvno-moždane barijere očuvani (62, 63).

Pored toga, primena SFN dovela je do poboljšanja ponašanja sličnog depresiji kod pacova delujući na metabolizam serotonina i inhibirajući njegovo preuzimanje od strane presinaptičkih nervnih završetaka (64).

1.1.3. Toksičnost

Toksikološki profil SFN je za sada nedovoljno ispitan, ali dostupne studije ukazuju da može imati potencijal za izazvanje brojnih štetnih efekata. Na primer, *in silico* ispitivanje otkrilo je hepatotoksični potencijal SFN, zatim mogućnost za izazivanje štetnih efekata na koži, kao i mutageni potencijal na osnovu hemijske strukture i interakcije sa genima (65). Takođe, u studiji na miševima praćen je efekat visokih doza na pojavu toksičnih efekata, pri čemu je pokazano da primena 150-300 mg/kg t.m./dan hemijski dobijenog D,L-SFN indukuje sedaciju, hipotermiju, poremećaje motorne koordinacije i dovodi do smanjenja snage skeletnih mišića (66). Dodatno, modifikovanjem aktivnosti Nrf2 signalnog puta, SFN može uticati na funkciju tiroidne žlezde i remetiti sintezu tiroidnih hormona (67). Važno je napomenuti da su dokazi o potencijalnoj toksičnosti SFN, uglavnom zasnovani na *in silico* studijama koje pružaju dragocene uvide u mehanizme koji stoje iza efekata SFN, ali su njihovi nalazi ograničeni i treba ih potvrditi daljim istraživanjima i eksperimentalnom validacijom.

1.2. Inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Novi pristup u terapiji malignih oboljenja je upotreba specifičnih formi bakterija koje bi mogle da prevaziđu ograničenja konvencionalnih terapija koje se koriste u lečenju malignih oboljenja kao što su hemio- i radioterapija (68, 69). Poznato je da bakterije ispoljavaju antitumorske efekte aktiviranjem imunskog odgovora posredstvom različitih mehanizama, kao na primer povećanje reaktivnih kiseoničnih vrsta i time inflamatornog odgovora ili stimulaciju efektorskih T-ćelija koje imaju antitumorsku aktivnost (70). Studije su pokazale da određeni sojevi bakterija poput *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* i *Pseudomonas aeruginosa* imaju visok antitumorski potencijal (71). Upotreba specifičnih formi bakterija u lečenju različitih vrsta tumora pokazuje obećavajuće rezultate. Osim toga, mali broj pratećih neželjenih efekata na zdrave ćelije, daje dodatnu prednost upotrebi bakterija kao adjuvantnih agenasa (72). Različite vrste živih inaktivisanih bakterija, genetski modifikovane bakterije, kao i bakterijski metaboliti korišćeni su sa ciljem zaustavljanja rasta i razvoja tumorskih ćelija (72, 73). Takođe, spore anaerobnih bakterija iskorišćene su za sintezu, razvoj i proizvodnju antitumorskih agenasa, ali i kao nosači za isporuku lekova do tumorskih tkiva (73). Bakterijske spore ispoljavaju antitumorski potencijal u kontaktu sa hipoksijom-izazvanim nekrotičnim tkivom, gde dalje klijaju i razmnožavaju se. Sredinom 20. veka, istraživači su pokazali da genetski modifikovane bakterije selektivno deluju na tumore i utiču na ekspresiju enzima uključenih u proces apoptoze u tumorskim ćelijama (74). Do sada, najviše proučavani biološki modifikovani sojevi bakterija su *Salmonella*, *Clostridium* i *Listeria*. Ipak, sve veći broj modifikovanih bakterija ispituje se zbog njihovog antitumorskog potencijala, među kojima je i *Pseudomonas aeruginosa* (75).

1.2.1. Način dobijanja i primena

Pseudomonas aeruginosa je gram-negativna, aerobna bakterija koja može izazvati ozbiljne infekcije kod pacijenata sa oslabljenim imunskim sistemom (76). Iako se *Pseudomonas aeruginosa* klasifikuje kao aerobna bakterija, ona zapravo funkcioniše kao fakultativna anaerobna bakterija, sposobna za preživljavanje i proizvodnju energije i u uslovima smanjenog prisustva kiseonika korišćenjem alternativnih akceptora elektrona poput nitrata (NO_3^-), nitrita (NO_2^-), i azot(I)-oksida (N_2O) (77). Dok je živ oblik *Pseudomonas aeruginosa* visoko virulentan i može izazvati fatalne infekcije kod ljudi, inaktivisan oblik *Pseudomonas aeruginosa*, koji je dodatno genetski modifikovan kao i njen toksin, egzotoksin A, pokazuju imunomodulirajuću i citotoksičnu antitumorsku aktivnost (78-80). Genetski modifikovani podtip bakterije, *Pseudomonas aeruginosa* sa eksprimiranim manozom osetljivim hemaglutininskim fimbrijama (engl. *Mannose Sensitive Hemagglutination*, MSHA), predstavlja soj bakterije umrtvljen na temperaturi od 65 °C, a potom korišćenjem biološkog inženjeringa obložen krhkim i pravim manozom osetljivim hemaglutininskim fimbrijama (81). Površinski sloj MSHA smanjuje toksični potencijal *Pseudomonas aeruginosa* i to tako što onemogućava eksprimiranje štetnih faktora virulencije na površini bakterije (82). *In vivo* i klinički podaci pokazuju da PA-MSHA može stimulisati imunski odgovor putem TLR4 signalnog puta (engl. *Toll-like receptor 4 signaling*) i tako sprečiti nastanak sepse nakon hirurškog zahvata. PA-MSHA stimuliše oslobađanje proinflamatornih citokina ($\text{TNF}\alpha$, IL-1 β i IL-6) 8 dana nakon intervencije, ali povećava i sekreciju antiinflamatorne citokina (IL-4 i IL-10) nakon 16 dana, balansirajući tako aktivnost imunskog odgovora u cilju prevencije infekcija (78, 83). PA-MSHA odobrena je kao komplementarna antitumorska terapija još 1998. godine u Kini zahvaljujući pokazanim imunomodulišućim i antitumorskim karakteristikama. Ova komplementarna terapija ima za cilj stimulaciju imunološkog odgovora pacijenata i time

poboljšanje lečenja malignih tumora kao što su karcinom dojke, želuca, bešike, hepatocelularni i kolorektalni karcinom (71, 84, 85).

PA-MSHA pokazuje pozitivne antitumorske efekte kod brojnih tumora i to intereagujući sa imunskim sistemom na različite načine: indukcijom M1 polarizacije makrofaga, stimulacijom Th1 imunskog odgovora i povećanjem sekrecije IFN γ , uz modulaciju sekrecije interleukina-10 (IL-10) i interleukina-4 (IL-4) (86, 87).

U ovoj doktorskoj disertaciji korišćen je termin inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* koji se odnosi na PA-MSHA u cilju lakšeg praćenja rezultata i diskusije.

1.2.2. Antitumorski potencijal

1.2.2.1. *In vitro* studije

Sve više podataka ukazuje da PA-MSHA može inhibirati rast ćelija tumora i indukovati apoptozu ćelija u *in vitro* okruženju, s tim da literaturni podaci pokazuju inhibiciju rasta ćelija u opsegu od 11% do 26%, što se prema nekim autorima ne može smatrati citotoksičnim efektima. Na primer, Zhao i sar. (2016) su pokazali da PA-MSHA može izazvati apoptozu i zaustaviti ćelijski ciklus u različitim ćelijama krupnoćelijskog karcinoma pluća (PC-9, A549 i NCI-H1975) na vremenski i dozno-zavisni način. Kao najosetljivija ćelijska linija izdvojila se NCI-H1975 sa IC₅₀ od 0,140 x 10⁹/ml nakon 72 sata, dok je u ćelijama A549 IC₅₀ nakon 72 sata iznosio 0,922 x 10⁹/ml. Osim toga, pokazano je da PA-MSHA stimuliše unutrašnji apoptotski put povećavajući nivo aktivne kaspaze 3 i kaspaze 9 u ćelijama tretiranim PA-MSHA (71). Dodatno, pokazano je da kombinacija PA-MSHA sa gefitinibom ispoljava jači apoptotski potencijal prema karcinomu pluća, *in vitro* i *in vivo*, nego svaki od agenasa pojedinačno. Takođe, kombinacija PA-MSHA i gefitiniba dovodi do povećanog aktiviranja kaspaze-3 i kaspaze-9, kao i inhibicije EGFR-zavisne aktivacije AKT/ERK signalnog puta uključenog u preživljavanje tumorskih ćelija (88).

PA-MSHA inhibira proliferaciju humanih ćelijskih linija karcinoma dojke i stimuliše njihovu apoptozu. Protočnom citometrijom utvrđeno je da PA-MSHA dovodi do zastoja ćelijskog ciklusa u G₀/G₁ fazi, sprečavajući proliferaciju tumorskih ćelija dojke. Dodatno, povećan nivo aktiviranih kaspaza 3, 8, 9 i proteina Fas ukazao je na veći stepen apoptoze tumorskih ćelija tretiranih PA-MSHA u poređenju sa kontrolnom grupom (89). Takođe, uočeno je i da PA-MSHA pokazuje antitumorski potencijal prema ćelijama rezistentnim na doksorubicin, MCF-7/ADR, ali ne i na ćelijama osetljivim na pomenuti citostatik, nakon 12 i 48 sati. Osnovni mehanizam se može bar delimično objasniti sniženom ekspresijom Nrf2/p62 (90).

Yin i sar. (2016) tretirali su ćelijske linije humanog karcinoma grlića materice PA-MSHA tokom 24, 48 i 72 h. Inhibicija rasta ćelija bila je najizraženija nakon 72 sata, dok je antitumorski potencijal PA-MSHA primećen pri svim ispitivanim dozama (0,15 x 10⁹/ml, 0,3 x 10⁹/ml i 0,6 x 10⁹/ml), pri čemu je najjači citotoksični potencijal uočen kod ćelija izloženih najvišoj dozi PA-MSHA (0,6 x 10⁹/ml) (91). Slični rezultati viđeni su i na ćelijama karcinoma bešike; PA-MSHA je indukovao dozno-zavisnu inhibiciju rasta tumorskih ćelija, stimulacijom ekspresije kaspaza 8 i 9, kao i proteina Fas. Takođe, u ćelijama tretiranim PA-MSHA uočeno je smanjenje aktivnosti PI3K/AKT signalnog puta (92).

PA-MSHA zaustavlja deobu ćelija hepatocelularnog karcinoma u S fazi ćelijskog ciklusa i, na taj način, stimuliše njihovu apoptozu. Ovaj efekat je posredovan manoznim ostacima na bakterijskoj površini, koji direktno aktiviraju kaspazu-8 i receptorski (spoljašnji) apoptotski put (93). Pored toga, PA-MSHA smanjuje transkripciju gena odgovornog za sintezu PD-L1 i time smanjuje njegovu ekspresiju na ćelijama hepatocelularnog karcinoma (94). PD-L1 se vezuje za svoj receptor PD-1 na površini T-efektorskih ćelija, što zaustavlja aktivaciju T ćelija i inhibira imunski odgovor. Drugim rečima, eksprimirajući PD-L1 na svojoj površini tumorske ćelije ga koriste kao strategiju da izbegnu imunološki odgovor domaćina (95). Takođe, antitumorski efekti PA-MSHA mogu se povezati s aktivacijom ćelija imunskog sistema, pre svega prirodnih ćelija ubica stimulisanih citokinima (CIK), i smanjenjem ekspresije inhibitornih molekula na površini ćelija, pre svega PD-1 i CTLA-4 (96). PA-MSHA promovise diferencijaciju/sazrevanje dendritskih ćelija posredstvom TLR i time aktivira Th1-imunski odgovor, što dovodi do povećane sekrecije IFN γ , i smanjene sekrecije imunoregulatornih citokina, IL-10 i IL-4. Važno je napomenuti da je ovaj efekat primećen samo u dozi do $1,15 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$, dok su više doze izazvale smanjenu aktivnost dendritskih ćelija (97). Na osnovu prethodno pomenutih *in vitro* rezultata, može se pretpostaviti da PA-MSHA doprinosi antitumorskom efektu kroz: 1) stimulaciju apoptoze tumorskih ćelija; 2) aktivaciju imunskih ćelija i stimulaciju citotoksičnog imunskog odgovora.

1.2.2.2. *In vivo* studije

Antitumorska svojstva PA-MSHA pokazana su u brojnim *in vivo* studijama (98, 99). Na primer, subkutana primena PA-MSHA ($2,2 \times 10^{10}$ ćelija/ml) tokom 45 dana smanjuje rast i razvoj malignih tumora dojke sa pojačanom ekspresijom EGFR (99). Slično tome, u studiji na mišjem modelu adenokarcinoma pankreasa sa pojačanom ekspresijom EGFR, subkutana primena PA-MSHA ($2,2 \times 10^{10}$ /ml) u kombinaciji sa paklitakselom (10 mg/kg, 2 puta nedeljno, tokom 7 nedelja) dovela je do apoptoze tumorskih ćelija i inhibicije rasta i razvoja tumora (100).

Ova bakterija inhibirala je rast tumora, smanjila invazivnost i podstakla apoptozu tumorskih ćelija, pretežno putem aktivacije transkripcionog faktora NF- κ B, neophodnog za sintezu proteina uključenih u ćelijski ciklus ćelija tumora. PA-MSHA stimuliše M1 polarizaciju makrofaga. Makrofagi se kategorizuju u dva fenotipa: M1, proinflamatorni makrofagi sa antitumorskim karakteristikama, i M2 makrofagi, koji stimulišu angiogenezu i rast tumora. Stoga, povećanjem odnosa M1 prema M2 makrofagama, PA-MSHA stimuliše imunski odgovor u tumorskoj mikrosredini i time smanjuje veličinu tumora (101, 102). Takođe, istraživanja na modelu miševa kojima su injektovane tumorske ćelije, pokazala su da PA-MSHA dovodi do povećanja broja efektorskih T ćelija i nivoa proinflamatornih citokina, poput IFN γ i TNF α , u serumu, čime ostvaruje antitumorske efekte (103). Slično tome, u studiji sprovedenoj od strane Hung i sar. (2022), PA-MSHA u kombinaciji sa anti-PD1-antitelom, suzbija rast tumora i produžava preživljavanje miševa u eksperimentalno indukovanom tumoru posredstvom imunskog sistema (101). Još jedan antitumorski mehanizam PA-MSHA uključuje inhibiciju EGFR signalnog puta i posledičnu aktivaciju apoptotskog procesa. Važno je napomenuti da je PA-MSHA indukovao apoptozu samo tumorskih ćelija dok su zdrave ćelije urotela (epitela prelaznog tipa koji oblaže urinarni trakt) ostale intaktne što ukazuje na potencijalno selektivno dejstvo PA-MSHA usmereno na tumorske ćelije (104).

Zhang i sar. (2022) su pokazali efikasnost PA-MSHA u lečenju kolorektalnog karcinoma rezistentnog na cetuksimab i to sprečavanjem širenja metastaza tumora, kao i indukcijom apoptoze tumorskih ćelija putem signalnog puta miR-7-5p/Akt/Wnt- β -catenin, koji je

suprimiran kod tumorskih ćelija rezistentnih na cetuksimab. PA-MSHA tretman stimuliše ekspresiju miR-7-5p, inhibira Akt sintezu, inaktivira Wnt- β -katenin signalni put i konačno, stimuliše apoptozu (82).

Cheng i sar. (2016) su pokazali da PA-MSHA-indukovana apoptoza tumora pankreasa zavisi od inhibicije EGFR signalnog puta. U ksenograftskom modelu adenokarcinoma pankreasa, miševi su tretirani sa subkutanom injekcijom PA-MSHA (2×10^{10} /ml), 0,1 ml dnevno, ili kombinacijom PA-MSHA i Nab-paklitaksela (10 mg/kg, dva puta nedeljno) tokom 7 nedelja. Po završetku tretmana utvrđeno je da PA-MSHA dovodi do smanjenja zapremine tumora, aktivacije kaspaze-3 i posledično apoptoze, samostalno ili u kombinaciji sa Nab-paklitakselom. Pored toga, PA-MSHA inhibira EGFR signalni put na dozo-zavisni način (100). Opisani su i drugi mehanizmi apoptoze tumorskih ćelija izazvane od strane PA-MSHA. Na primer, Xu i sar. (2014) su objasnili da PA-MSHA može stimulisati stres endoplazmatskog retikuluma (ER) i time aktivirati apoptotski proces (84). Međutim, neki dokazi ukazuju da stres ER doprinosi rastu i razvoju tumora kroz indukciju autofagije. Autofagija predstavlja metabolički proces koji pomaže ćelijama tumora u kasnim fazama razvoja da prežive u uslovima povišenog stresa, kao što je tumorsko okruženje koje je deficitarno nutritijentima (105). Stoga su, Xu i kolege tretirali životinje obolele od tumora kombinacijom PA-MSHA i inhibitorom autofagije, što je dovelo do smanjenja veličine tumora i boljeg ukupnog preživljavanja tretiranih životinja (84).

Kao što je već pomenuto, antitumorski efekat PA-MSHA zavisi od aplikovane doze. Tretman 10^8 ćelije/ml PA-MSHA jednom nedeljno tokom 3 nedelje dovodi do efikasnijeg suzbijanja rasta tumora i produžava vreme preživljavanja miševa sa tumorom pluća u odnosu na niže doze (97). Međutim, Wang i sar. (2022) su pokazali da PA-MSHA može stimulisati imunski odgovor i inhibirati imunosupresivne molekule i kod miševa koji nemaju tumor dok su miševi sa tumorom, tretirani PA-MSHA pokazali povećanu ekspresiju PD-L1 proteina na efektorskim ćelijama, što je rezultiralo neuspehom u lečenju. Stoga je, održavanje ravnoteže između adaptivnog i urođenog imunskog odgovora ključno za uspešno lečenje tumora PA-MSHA (106).

Studije na životinjama pokazale su obećavajuće rezultate u vezi sa upotrebom PA-MSHA u lečenju različitih vrsta malignih oboljenja, poput karcinoma pluća, bešike, dojke, kolona, želuca, pankreasa i hepatocelularnog karcinoma (98-106). Utvrđeno je da je PA-MSHA efikasan u inhibiciji rasta tumora i produženju preživljavanja životinja, sa ograničenim podacima o njegovom toksičnom potencijalu. Dostupni podaci ukazuju da PA-MSHA poseduje pažljivo izbalansirane imunomodulatorne karakteristike (97, 101-103). Međutim, nekoliko aspekata njegovog mehanizma delovanja još uvek ostaje nerazjašnjeno, kao na primer, da li trenutni status imunskog sistema utiče na efekte PA-MSHA *in vivo*. Potrebna su dalja istraživanja s ciljem ispitivanja potencijalnih pozitivnih i negativnih efekata PA-MSHA.

1.2.2.3. Kliničke studije

Slično rezultatima dobijenim u sprovedenim *in vivo* studijama, primena PA-MSHA kod ljudi dovodi do modulacije imunskog odgovora domaćina kroz interakciju sa T-ćelijskim odgovorom, stimuliše diferencijaciju dendritičnih ćelija i povećava polarizaciju proinflamatornih M1 makrofaga (107). Prvi klinički podaci prijavljeni su još 1999. godine kada su Li i sar. (1999) tretirali pacijente sa karcinomom pluća, sa PA-MSHA u kombinaciji sa hemioterapijom tokom 10 nedelja pri čemu je uočeno da primena PA-MSHA smanjuje stopu infekcija u poređenju sa kontrolnom grupom (15,91% naspram

40%) i poboljšava funkciju imunskog sistema. Naime, kod pacijenata tretiranih PA-MSHA bio je veći broj urođenoubilačkih (engl. *Natural Killer*, NK) ćelija i izmereni su viši nivoi proinflatarnog IL-2, kao i viši odnos CD4/CD8 efektorskih T-ćelija u poređenju sa kontrolnom grupom (108). Ista istraživačka grupa sprovedla je još jedno kliničko ispitivanje u kom je dodatak PA-MSHA poboljšao efikasnost hemioterapije sa 69,77% na 95,56% kod pacijenata sa malignim limfomom i sa 42,22% na 59,09% kod pacijenata sa karcinomom pluća (109). PA-MSHA pokazao je pozitivne antitumorske efekte kod pacijenata sa karcinomom dojke tretiranih TAC (docetaxel, doxorubicin i ciklofosamid) protokolom. Nakon dva ciklusa hemioterapije, kod pacijenata koji su primali PA-MSHA uočeno je značajno smanjenje veličine tumora, čime je omogućena resekcija hirurškim putem (110). Takođe, pacijenti oboleli od metastatskog HER-2 negativnog karcinoma dojke, tretirani kombinacijom kapecitabina i PA-MSHA imali su duže vreme preživljavanja bez progresije bolesti i duže ukupno preživljavanje. Osim toga, istraživači su primetili da su umereni neželjeni imunski događaji kao što su groznica ili induracija kože na mestu injekcije bili u vezi sa boljim ishodom tretmana, što ukazuje na dozno-zavisne efekte PA-MSHA (111). Gong i sar. (2023) sprovedli su skorašnju studiju u kojoj je 75 pacijenata sa HER-2 negativnim karcinomom dojke tretirano paklitakselom i karboplatinom sa ili bez PA-MSHA. Uočeno je da dodatak PA-MSHA neoadjuvantnoj hemioterapiji poboljšava klinički odgovor pacijenata sa malignim tumorom modulišući imunski odgovor domaćina. Pacijenti kod kojih je primenjena PA-MSHA imali su viši nivo IFN γ i procenat efektorskih T-ćelija u krvi, kao i CD8⁺/CD4⁺ T-ćelija, CD8⁺CD28⁺ T-ćelija, i NK ćelija. Pored toga, detektovan je snižen nivo IL-4 u serumu, što sve ukazuje na aktivaciju imunskog sistema posredovanu primenjenom terapijom. Bolji odgovor na primenjeni tretman uočen je kod pacijenata sa izraženim neželjenim imunskim događajima što ukazuje na ključnu ulogu imunskog sistema stimulisanog od strane PA-MSHA u lečenju malignih oboljenja (85).

Na kraju, Zhang i sar. (2017) sprovedli su kliničko istraživanje koje je uključilo 20 pacijenata sa karcinomom pluća, jajnika, kolona, rektuma i jednjaka. Pacijenti su podeljeni u 2 grupe, pri čemu je prva primala hemioterapiju plus CIK ćelije dobijene iz matične krvi pacijenta, dok je druga primala hemioterapiju plus CIK ćelije tretirane PA-MSHA. Primećeno je da PA-MSHA stimuliše proliferaciju CIK ćelija i smanjuje ekspresiju površinskih inhibicionih markera, kao što su Tim-3 i PD-1. Osim toga, CIK ćelije tretirane PA-MSHA luče više proinflatarnih citokina poput IFN γ , što ukazuje na jaču aktivaciju imunskog sistema (112).

1.2.3. Toksičnost

Iako detaljne toksikološke studije još uvek nisu sprovedene ili rezultati nisu dostupni, podaci dobijeni u *in vivo* i kliničkim studijama ukazuju na dobar sigurnosni profil inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. PA-MSHA može izazvati ne-hematološke nuspojave kao što su iritacija kože u 44,3% pacijenata, sindrom šaka-stopalo (crvenilo, oticanje, bol i pukotine na dlanovima i tabanima) u 32%, groznicu kod 29,9%, kao i osip kod 5,2% pacijenata obolelih od HER-2-negativnog metastatskog karcinoma dojke kada se koristi u kombinaciji sa taksolom. Štaviše, PA-MSHA je izazvao blagu do umerenu hematološku toksičnost, dok se kod 5% pacijenata javio težak oblik neutropenije, leukopenije i trombocitopenije (111). Gong i sar. (2023) opisali su iste nuspojave kod pacijenata obolelih od malignih bolesti, pri čemu su najčešći neželjeni efekti bili blago do umereno oštećenje kože na mestu primene injekcije, osip i groznica. Međutim, kod 64,9% pacijenata prijavljen je bar jedan neželjeni efekat stepena 3 ili 4 (težina neželjenih efekata opisana je skalom od 1 do 4). Najčešći ozbiljni neželjeni efekti bili su neutropenija i leukopenija, koje su se javile kod 59,5% i 4,5% pacijenata, respektivno. Pored hematološke toksičnosti, primećena je ozbiljna periferna neuropatija kod 5,4% tretiranih

pacijenata. Međutim, važno je napomenuti i da je ozbiljnost pomenutih štetnih efekata pozitivno korelirala s ishodom terapije, potvrđujući ulogu imunskog sistema u regresiji malignih tumora (85). Sve prijavljene nuspojave povezane su s oslobađanjem proinflamatornih citokina, uglavnom IFN γ , i stimulacijom imunskog sistema (113). S druge strane, Chen i sar. (2009) pokazalu su da PA-MSHA smanjuje učestalost i ozbiljnost neželjenih efekata kao što su edemi, nekroza kožnog reznja i infekcije, kod pacijenata obolelih od karcinoma dojke, a kod kojih se primenjuje TAC protokol (110), ukazujući na potrebu za dodatnim razumevanjem toksičnog potencijala PA-MSHA kroz *in silico*, *in vitro* i *in vivo* ispitivanje toksičnosti.

Inaktivisana bakterija može biti koristan adjuvantni/komplementarni agens hemioterapiji, zahvaljujući dozno-zavisnom uticaju na inhibiciju rasta i razvoja različitih vrsta tumora, poput limfoma, karcinoma pluća i dojke. Inhibicija ćelijskog ciklusa, indukcija apoptoze i aktivacija imunskog sistema predloženi su kao osnovni mehanizmi antitumorskog dejstva PA-MSHA. Međutim, neophodna je evaluacija njenog bezbednosnog profila kroz *in vitro* i *in vivo* istraživanja kako bi se objasnio odnos koristi i rizika primene PA-MSHA kod pacijenata obolelih od malignih bolesti.

1.3. Kombinovana primena imunomodulatora

Za sada u dostupnijoj literaturi nema podataka o kombinovanoj primeni imunomodulatora SFN i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Brojna istraživanja pokazala su da su SFN i PA-MSHA prepoznati kao imunomodulatori sa potencijalnom da pokrenu ili zaustave imunski odgovor. Dijetetski suplementi sa ekstraktom semena brokolija standardizovani na SFN široko su dostupni u praksi. Osim toga, brojne kliničke studije se sprovode sa ovom molekulom u terapiji različitih bolestim dok se pozitivna svojstva sintetski dobijenog SFN (D,L-SFN) sve više istražuju. Na drugoj strani, PA-MSHA je našla primenu u Narodnoj Republici Kini i koristi se već preko dve decenije kao dodatna terapija u lečenju karcinoma. Međutim, nema podataka o njihovoj kombinovanoj primeni, niti dostupnih *in silico*, *in vitro* ili *in vivo* ispitivanja koja bi razjasnila, ne samo pozitivan efekat njihove zajedničke primene, već i utvrdila granične nivoe toksičnosti kao polaznu osnovu za utvrđivanje bezbedne doze njihove kombinovane primene.

1.4. Ispitivanje toksičnosti

Testovi toksičnosti se tradicionalno sprovode na eksperimentalnim životinjama, ali budući da su vremenski, finansijski i etički zahtevni, čine se veliki naponi kako bi se razvili novi, validirani *in vitro* modeli ispitivanja toksičnosti. Takođe, u poslednje vreme sve se više koriste *in silico* metode koje koriste brojne računarske tehnike za analiziranje, simuliranje, vizualiziranje, ili predviđanje toksičnosti korišćenjem podataka u dostupnim bazama podataka (11). Pored *in silico* i *in vitro* testova, poslednjih godina, sve veću ulogu u ispitivanjima toksičnosti zauzima i model zebrice (*Danio rerio*) čije se prednosti ogledaju u kratkom reproduktivnom ciklusu, sličnosti genoma sa humanim genomom, i mogućnošću optičkog praćenja promena zahvaljujući njihovoj transparentnosti (12). Ove metode, pre svega, nastoje da predvide toksičnost ili genetsku predispoziciju na štetno dejstvo različitih jedinjenja formirajući osnovu za dalja *in vitro* i *in vivo* istraživanja. Dodatno, kombinovanjem *in silico*, *in vitro* i *in vivo* analiza mogu se detaljno razjasniti mehanizmi nastanka toksičnosti, dovodeći ih u vezu sa razvojem različitih štetnih efekata, kao na primer sa poremećajima na nivou krvi, jetre, bubrega, kardiovaskularnog sistema, reproduktivnih organa, ali i drugih poremećaja na nivou organizma.

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu sve veću incidencu pojave malignih bolesti i nedovoljnu efikasnost dostupnih terapijskih pristupa, potreba za uvođenjem novih lekovitih supstanci u terapijske protokole je evidentna. Velike nade polažu se u primenu imunomodulatora, među kojima su i SFN i PA-MSHA, koji će poboljšati terapiju malignih tumora pojačavanjem imunskog odgovora. Ovo je posebno od značaja kada se primenjuju drugi terapijski postupci koji u značajnoj meri oštećuju i slabe dejstvo imunskog sistema. Brojne studije potvrdile su pozitivne efekte pojedinačne primene SFN (standardizovanog biljnog ekstrakta) i PA-MSHA, dok se sintetski dobijen SFN za sada koristi isključivo u eksperimentalne svrhe. U cilju njihove bezbedne primene, posebno hemijski sintetisanog SFN, neophodno je ispitati i potencijal za izazivanje toksičnih efekata. S obzirom na to da je broj studija toksičnosti imunomodulatora SFN i PA-MSHA gotovo zanemarljiv, postoji potreba za sveobuhvatnom analizom toksičnosti pojedinačnih imunomodulatora, ali i toksičnosti njihove kombinovane primene. Posebno je od značaja da se ispita da li su toksični efekti dozno-zavisni, kao i da li se toksični efekti kombinovane primene ovih imunomodulatora razlikuju od štetnih efekata pojedinačno primenjenih imunomodulatora. Neophodnost ovih istraživanja je evidentna za poboljšanje terapije malignih bolesti i dobijeni rezultati bi pružili naučni doprinos pri odabiru bezbednih doza za kombinovanu primenu imunomodulatora.

Opšti cilj istraživanja ove doktorske disertacije je bio da se sveobuhvatno ispita toksičnost pojedinačne i kombinovane primene imunomodulatora, SFN i PA-MSHA uz razjašnjenje mehanizama toksičnosti ispitivanih imunomodulatora i utvrđivanje graničnih nivoa toksičnosti izračunavanjem *Benchmark* koncentracije/doze. Dodatno, *in vitro* testovi u ovoj disertaciji koristili su se kako bi se pokazao antitumorski efekat pojedinačne i kombinovane primene SFN i PA-MSHA i odredile koncentracije ispitivanih imunomodulatora koje ispoljavaju antitumorski efekat.

Specifični ciljevi istraživanja u okviru svakog dela ispitivanja ove doktorske disertacije su:

In silico analizom

- Ispitati odnos strukture i dejstva SFN, zatim povezanost SFN sa razvojem bolesti/štetnih efekata posredstvom interakcija sa genima, kao i potencijal za izazivanje negativnih efekata kod pacijenata obolelih od različitih vrsta malignih tumora;
- Ispitati povezanost PA-MSHA sa razvojem različitih bolesti/štetnih efekata posredstvom interakcija sa genima;
- Pronaći zajedničke, SFN i PA-MSHA intereagujuće gene i za njih istražiti najznačajnije molekularne puteve, biološke procese i molekularne funkcije uključene u mehanizam toksičnosti ispitivanih imunomodulatora pojedinačno i pri kombinovanoj primeni.

In vitro ispitivanjem

1. Ispitati uticaj rastućih koncentracija SFN i PA-MSHA, pojedinačno i u kombinaciji na citotoksičnost/antiproliferativno dejstvo;
2. Ispitati uticaj SFN na uvođenje tumorskih ćelija u apoptotsku ćelijsku smrt, distribuciju tumorskih ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, promenu mitohondrijskog membranskog potencijala ($\Delta\psi_m$) tumorskih ćelija, nivo mitohondrijskog superoksid anjon radikala i nivo ukupnih reaktivnih kiseoničnih vrsta.

In vivo ispitivanjem na modelu zebrica (*Danio rerio*)

1. Ispitati toksične efekte SFN i/ili PA-MSHA u različitim koncentracije na preživljavanje, uticaj na rast i razvoj, uticaj na razvoj mehura, kardiotoksičnost, hepatotoksičnost.
2. Ispitati doznu zavisnost toksičnih efekata SFN i/ili PA-MSHA:
 - Uporediti toksične efekte ispitivanih imunomodulatora pri pojedinačnoj i kombinovanoj primeni kod zebrica;
 - Odrediti *Benchmark* koncentracije za imunomodulatore pri pojedinačnoj i kombinovanoj primeni za ispitivane toksične efekte na embrionima zebrica.

In vivo ispitivanjem na modelu pacova

1. Ispitati uticaj subakutne (28 dana) ekspozicije imunomodulatorima (SFN i/ili PA-MSHA) u različitim dozama na:
 - Unos vode i hrane, piraste telesne mase i relativnu masu organa;
 - Hematološke i biohemijske parametre;
 - Hormonski status;
 - Produkciju različitih citokina i drugih proteina;
 - Parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u krvi i tkivima pacova;
 - Očuvanost strukture tkiva patohistološkom analizom.
2. Ispitati doznu zavisnost toksičnih efekata SFN i/ili PA-MSHA:
 - Uporediti toksične efekte kombinovane primene ispitivanih imunomodulatora sa toksičnim efektima njihove pojedinačne primene kod pacova;
 - Odrediti *Benchmark* doze za imunomodulatore pri pojedinačnoj i kombinovanoj primeni za ispitivane toksične efekte.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. *In silico* ispitivanje

3.1.1. Analiza odnosa strukture i dejstva

Analiza odnosa strukture i dejstva, odnosno predviđanje toksičnosti na osnovu hemijske strukture SFN sprovedeno je korišćenjem softvera *Derek Nexus* 2020, verzija 1.0 (*Lhasa Limited, Leeds, Yorkshire, Ujedinjeno Kraljevstvo*). Ovaj softver je komercijalni softver koji se može koristiti za kvalitativno predviđanje toksičnosti supstanci na osnovu njihove hemijske strukture koristeći pravila zasnovana na hipotezama izvedenim iz dostupnih toksikoloških i hemijskih podataka. Baza podataka *Derek Nexus* softvera sadrži informacije koje povezuju hemijsku strukturu i toksični efekat obuhvatajući širok spektar toksičnih ishoda. Podaci *Derek Nexus* baze podataka se između ostalog koriste za predviđanje mutagenog i karcinogenog potencijala testirane supstance, kao i njenog uticaja na senzibilizaciju kože (114, 115). Program ima grafički interfejs za unos prethodno pripremljenih ili kreiranih hemijskih struktura koje su predmet analize. Na osnovu dostupnih podataka, sistem prepoznaje delove strukture koji mogu intereagovati s biološkim sistemima i dovesti do pojave toksičnih efekata, koje se nazivaju „toksofore”. Svaka toksofora praćena je sažetkom podataka, koji ukazuje na identifikovani rizik, kao i listom referenci koje navode vezu između toksofore i potencijalne toksičnosti (114, 116).

U ovom radu korišćena je SMILES formula D,L-SFN, CS(=O)CCCCN=C=S (PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulforaphane>). Predviđanje toksičnosti PA-MSHA na osnovu hemijske strukture nije primenljivo.

3.1.2. Toksikogenomička analiza podataka

In silico analiza toksikogenomičkih podataka podrazumeva ispitivanje uticaja hemikalija na ekspresiju gena, kao i njihovu vezu sa nastankom bolesti, korišćenjem softvera, baza podataka, alata i programskih jezika. U ovoj doktorskoj disertaciji korišćeni su:

1. Komparativna toksikogenomička baza podataka (engl. *Comparative Toxicogenomics Database*, CTD; <http://ctdbase.org>), javno dostupna baza podataka koja sadrži informacije o interakcijama hemikalija i gena, kao i njihovu vezu sa razvojem bolesti, preuzete iz dostupne literature, pri čemu korisnik može pristupiti svoj korišćenoj literaturi. Razumevanje veze hemikalija-gen-bolest omogućava generisanje mreže puteva štetnih ishoda i mehanizama toksičnosti (117, 118). CTD baza se redovno ažurira, sadrži preko 86 miliona toksikogenomičkih interakcija i integriše podatke sa drugim bazama podataka: *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) i *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (119-121). CTD bazi pristupljeno je tokom decembra 2023. godine kada su preuzeti podaci vezani za ispitivani imunomodulator SFN, budući da baza ne sadrži podatke za PA-MSHA. Sama baza podataka sadrži i alate koji olakšavaju njeno pretraživanje i preuzimanje podataka od značaja za toksikogenomičku analizu. Alati korišćeni u ovom radu su: *Batch Query*, *Set Analyzer* i *CTD Tetramers*.

Batch Query korišćen je za pretragu podataka o SFN i PA-MSHA. Kako CTD ne sadrži podatke o PA-MSHA, dalje je korišćena za detaljniju analizu uticaja SFN na gene. *Set Analyzer* omogućava analizu setova gena i generisanje pojmova

ontologije gena, metaboličkih puteva i bolesti regulisanih od strane unetih gena. Nova alatka pridodata CTD bazi, *CTD Tetramers* predstavlja bioinformatički pristup koji integriše ručno kreirane interakcije zasnovane na literaturi s ciljem formiranja bloka informacija nazvanog „CGPD-tetramer”. Ovaj blok sastoji se od 4 jedinice organizovane tako da čine molekularni mehanizam koji povezuje unetu hemikaliju (SFN), sa interagujućim genom/ima, zatim fenotipom i bolešću kao krajnjim ishodom (122).

2. STITCH (engl. *Search Tool for Interacting Chemicals*, STITCH; <http://stitch.embl.de/>) baza podataka sadrži poznate i predviđene interakcije između hemikalija i proteina. Interakcije uključuju direktne (fizičke) i indirektne (funkcionalne) asocijacije koje potiču iz kompjuterski predviđenih veza, kao i informacija preuzetih iz drugih (primarnih) baza podataka kao što su DrugBank, Matador, Reactome, ChEMBL i druge (123). STITCH sadrži informacije za preko 9 miliona proteina iz 2031 različitih organizma. U istraživanju ove doktorske disertacije, STITCH je korišćena u cilju identifikovanja veze između SFN i proteina (decembar, 2023).
3. Literatura pretraga tokiskogenomičkih podataka o PA-MSHA sprovedena je korišćenjem PubMed baze podataka (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>, pristupljeno maja 2022.). PubMed je pretražen za sve publikacije koje sadrže *Pseudomonas aeruginosa mannose - sensitive hemagglutinin*, *Pseudomonas aeruginosa*-MSHA, ili PA-MSHA u svom naslovu. Pronađeno je ukupno 93 publikacija: 9, 45 i 39, redom. Nakon odbacivanja literaturnih podataka napisanih na jeziku koji nije engleski, ne-relevantnih studija i duplikata, preostale su 24 publikacije koje su sistematski analizirane sa ciljem identifikovanja gena čija je ekspresija izmenjena pod uticajem PA-MSHA (124).
4. *Cytoscape* (<https://cytoscape.org>) omogućava vizuelizaciju, modelovanje i analizu mreža interakcija između gena kombinujući podatke i alate iz različitih baza podataka koje sadrže informacije o proteinima, DNK i genetskim interakcijama. Pored toga, alati koji su dostupni u okviru *Cytoscape* softvera omogućavaju sprovođenje dodatnih analiza u cilju ispitivanja povezanosti gena i molekularnih funkcija, bioloških procesa, ili puteva nastanka štetnih efekata/bolesti (125, 126). *Cytoscape* plug-in dodaci korišćeni u ovoj studiji su:
 - a. STRING alat/cytoscape dodatak (<https://apps.cytoscape.org/apps/stringapp>) omogućava mrežnu analizu odnosno, pomaže u predviđanju međusobnih veza između ispitivanih gena iz seta i 20 srodnih gena pri čemu je nivo pouzdanosti podešen na $> 0,4$.
 - b. *Cytoscape* dodatak CytoHubba (<https://apps.cytoscape.org/apps/cytohubba>) iskorišćen je za identifikaciju top 20 gena, odnosno top 20 esencijalnih proteina iz mreže uz pomoć MCC metode (engl. *Maximal Clique Centrality*) pri čemu je nivo pouzdanosti podešen na $> 0,5$.
 - c. *Cytoscape* dodatak BINGO (<https://apps.cytoscape.org/apps/bingo>) služi za analizu ontologije gena (GO), odnosno predviđanje bioloških procesa i molekularnih funkcija regulisanih genima iz seta ($p < 0,05$). Analiza je ograničena na analizu gena iz ljudskog genoma, dok je hipergeometrijski test sa FDR korekcijom za višestruka testiranja izabran kao statistički test.
 - d. ClueGO + CluePedia: ClueGO integriše GO termine i KEGG/BioCard molekularne puteve formirajući mrežu GO/molekularnih puteva. Može da analizira jednu ili uporedi dve liste gena i sveobuhvatno vizuelizuje molekularne puteve i GO. Pri formiranju veza između GO termina i

molekularnih puteva korišćen je dvofazni hipergeometrijski statistički test sa Bonferroni step-down korekcijom i κ vrednošću 0,3. ClueGo analiza integrisana je sa CluePedia alatom koja služi za pretragu biomarkera povezanih sa molekularnim putevima iz mreže. CluePedia izračunava linearne i nelinearne statističke zavisnosti iz eksperimentalnih podataka dobijenih u *in silico*, *in vitro* i/ili *in vivo* studijama (127).

5. DAVID (engl. *Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*, DAVID; <https://david.ncifcrf.gov/>) predstavlja javno dostupan alat koji služi za analizu ontologije gena, kao i njihovu vizualizaciju na BioCarta i KEGG mapama, zatim omogućava proširenje liste gena od značaja funkcionalno sličnim genima kao i njihovo povezivanje sa bolestima (128). U ovoj disertaciji, DAVID je korišćen za analizu ontologije gena kako bi se potvrdili prethodno dobijeni rezultati.

3.1.3. Predviđanje toksičnosti na nivou gena

In silico analiza je sprovedena u cilju pronalaska različito eksprimiranih gena (engl. *Differentialy Expressed Genes*, DEG) u tumorskim tkivima. Različito eksprimirani geni između zdravog i tumorskog tkiva određeni su u tri vrste malignih tumora: karcinom kolona, prostate i pankreasa.

Ključne reči: „karcinom kolona”, „karcinom prostate” i „karcinom pankreasa” pretražene su u javno dostupnom repozitorijumu podataka, GEO (engl. *Gene Expression Omnibus*, GEO, ncbi.nlm.nih.gov/geo/). GEO sadrži genske profile uzoraka maligno izmenjenih tkiva i uporedne uzorke zdravih, neizmenjenih tkiva, kao i alate za identifikaciju, analizu i vizualizaciju podataka, kao što je GEO2R (129). Pretraživanje je ograničeno na *Homo sapiens*, i vrstu studija koje sadrže podatke o genskoj i RNK ekspresiji u odabranim vrstama tumora. Selekcija genskih setova izvršena je na osnovu broja uzoraka u setu (više od 6) i platforme korišćene za njihovo sekvencioniranje (*[HuGene-1_0-st] Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array [transcript (gene) version]*, *[HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array*). Tri seta gena (GSE41258, GSE62932 i GSE68468) za karcinom kolona i za karcinom pankreasa (GSE22780, GSE27890 i GSE183795) zadovoljila su kriterijume pretrage, odnosno dva za karcinom prostate (GSE6919 i GSE29079). Uzorci svakog od seta podeljeni su u dve grupe - primarno tkivo tumora i normalno/zdravo tkivo koje predstavlja kontrolu. DEG između uzoraka primarnog tumora i zdravog tkiva (kontrole) u GSE skupovima identifikovani su korišćenjem GEO2R alata (ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/). Na osnovu logFC vrednosti izdvojeni su geni sa povećanom ekspresijom (logFC>1) i geni sa smanjenom ekspresijom (logFC<-1), dok je p vrednost omogućila selekciju statistički značajnih gena ($p < 0,05$). Među detektovanim DEG, geni koji povećano eksprimirani, odnosno smanjeno eksprimirani u karcinomu kolona, prostate i pankreasa identifikovani su korišćenjem alata za crtanje Venn dijagrama (*Interactivenn*, <http://www.interactivenn.net/>) i formiranjem preseka između setova gena.

Dobijeni setovi gena, ukršteni su sa SFN-intereagujućim genima preuzetim iz CTD baze podataka i dalje analizirani prethodno objašnjenjom analizom ontologije gena. Povećano i smanjeno eksprimirani geni analizirani su zajedno u narednim koracima istraživanja.

3.2. Hemikalije i inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

U *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima, korišćeni su D,L-SFN ($\geq 90\%$, molekularna masa 177,29, Santa Cruz, Dalas, Teksas, SAD) i dimetilsulfoksid (DMSO, 99,9%, molekularna masa 78,13, Fisher Chemical, Loughborough, Velika Britanija).

Inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* suspendovana je u fosfatnom puferu (PA-MSHA, Beijing Wonder Biopharmaceutical Co., Ltd, Peking, Narodna Republika Kina). Jedan mililitar PA-MSHA sadrži $1,8 \times 10^9$ ćelija.

Ostale korišćene hemikalije, bile su visokog kvaliteta i analitičke čistoće (*p.a.*) obezbeđene iz komercijalnih izvora.

3.3. In vitro ispitivanje

3.3.1 Ćelijske linije

In vitro ispitivanje sprovedeno je na Institutu za onkologiju i radiologiju Beograd, Srbija. Sve ćelijske linije korišćene u ovoj doktorskoj disertaciji dobijene su od *American Type Culture Collection* (Rockville, MD). Ćelijske linije karcinoma kolona (HT-29 i HCT-116) i MRC-5 (fibroblasti pluća) su gajene kao jednoslojne kulture u hranljivom medijumu. Hranljivi RPMI 1640 medijum je rastvoren u sterilnoj dejonizovanoj vodi, nakon čega je dodat penicilin (192 U/ml), streptomycin (200 µg/ml), HEPES (25 mM), L-glutamin (3 mM) i 10% FCS (pH 7.2). Ćelije su gajene na 37 °C u 5% CO₂ u atmosferi povećane vlažnosti.

3.3.2. Citotoksičnost

Citotoksična aktivnost i antiproliferativni efekat SFN i PA-MSHA, pojedinačno i u kombinaciji ispitivana je u rasponu koncentracija 1-50 µmol/l za SFN i 1% do 10% (0,018-0,18 x 10⁹ ćelija/ml) za PA-MSHA na 72 h kontinualnog tretmana. Nakon tretmana citotoksična aktivnost, odnosno antiproliferativni efekat SFN i PA-MSHA određen je koristeći MTT test. MTT test je kolorimetrijska metoda bazirana na redukciji tetrazolijumskih soli. Tetrazolijumske soli se u metabolički aktivnim ćelijama brzo redukuju do formazana koji predstavljaju kolorimetrijski reagens za citohemijsku kvantifikaciju broja metabolički aktivnih ćelija. Nakon 72 h inkubacije ćelija sa ispitivanim jedinjenjima u mikrotitar pločama sa 96 udubljenja, dodato je 20 µl rastvora MTT, (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromida, Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Posle 4 h inkubacije tretiranih ćelija bojom, dodato je 100 µl 10% SDS. Apsorbancija je merena sledećeg dana. Ćelijsko preživljavanje je izračunato kao odnos apsorbancija na 570 nm (λ 570 nm) tretiranih i kontrolnih ćelija uvećanim 100 puta. Kao rezultat testa dobija se srednja inhibitorna koncentracija (IC₅₀), koja je numerički pokazatelj citotoksičnog potencijala i antiproliferativne aktivnosti ispitivanih imunomodulatora. IC₅₀ vrednost odgovara onoj statistički dobijenoj koncentraciji ispitivanog imunomodulatora pri kojoj je u datom vremenskom periodu došlo do 50% smanjenja u ćelijskom preživljavanju i predstavlja polazni parametar u daljem eksperimentalnom dizajnu ispitivanja mehanizma delovanja imunomodulatora.

3.3.3. Proapoptotski potencijal

Kinetika programirane ćelijske smrti u ćelijskim linijama kolorektalnog karcinoma tretiranih imunomodulatorima ispitana je u tri vremenska perioda (24, 48, i 72 h kontinualnog tretmana). Gubitak asimetrije plazma membrane predstavlja prvi korak u procesu apoptotske ćelijske smrti. U apoptotičnim ćelijama, membranski fosfolipid, fosfatidil-serin se premešta sa unutrašnje na spoljašnju stranu plazma membrane, čime se omogućava vezivanje Aneksin V (kalcijum zavisnog fosfolipid-vezujućeg proteina), koji

ima veliki afinitet za fosfatidil-serin. Za Aneksin V može biti vezana fluorescentna boja, kao što je fluorescejin izocijanat (FITC). Korišćenjem dvokolornog bojenja ćelija sa Annexin V-FITC i propidijum jodida (PI), moguća je detekcija ćelija u ranoj fazi apoptotske ćelijske smrti u odnosu na eseje bazirane na određivanju nuklearnih promena, kao što je DNK fragmentacija.

Proapoptotsko delovanje imunomodulatora na ćelijskim linijama HCT-116 i HT-29 ispitano je dvokolornim bojenjem (Aneksin V – FITC/PI) pri čemu su uzorci pripremljeni sledeći uputstva proizvođača. Udeo ćelija u apoptozi određen je na protočnom citometru FACS Calibur Becton Dickinson korišćenjem kompjuterskog programa *Cell Quest* (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Aneksin V+/PI- ćelije su definisane kao ćelije u ranoj apoptozi, a dvostruko pozitivne ćelije (Aneksin V+/PI+), kao ćelije u kasnoj apoptozi ili nekrozi.

3.3.4. Distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

Raspodela ćelija po fazama ćelijskog ciklusa ispitana je korišćenjem protočnog citometra. Ćelije uzgajane u Petrijevim šoljama (2×10^5 ćelija po Petrijevoj šolji dimenzija 60 x 15 mm, NUNC), kontinuirano su tretirane jedinjenjima u prethodno izračunatim IC50 koncentracijama (Tabela 1), tokom 24 ili 48 h. Ćelije su sakupljene tripsinizacijom, isprane dva puta hladnim fosfatnim puferom i fiksirane 30 minuta u 70% etanolu. Fiksirane ćelije su ponovo isprane fosfatnim puferom i inkubirane na 37 °C sa RNazom A (1 mg/ml) 30 minuta. Neposredno pre analize na protočnom citometru, ćelije su obojene propidijum-jodidom (PI, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) u koncentraciji 400 µg/ml. PI se vezuje za molekule DNK. Raspodela ćelija po fazama ćelijskog ciklusa na osnovu količine DNK analizirana je na protočnom citometru FACS Calibur Becton Dickinson korišćenjem kompjuterskog programa *Cell Quest* (BD Biosciences, San Diego, CA, SAD).

3.3.5. Promena mitohondrijskog membranskog potencijala

Jedan od početnih događaja u procesu apoptoze jeste depolarizacija mitohondrijske membrane i takvu promenu mitohondrijalnog membranskog potencijala je moguće detektovati. Promene mitohondrijskog membranskog potencijala ($\Delta\psi_m$) netretiranih i tretiranih tumorskih ćelija (HCT-116 i HT-29) praćene su bojenjem sa 5',6,6'-tetrahloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilkarbocijanin-jodidom (JC-1) (130) bojom na protočnom citometru. Ćelije su tretirane prethodno izračunatom IC50 koncentracijom imunomodulatora u jednoj vremenskoj tački, a potom je 1×10^6 ćelija resuspendovano je u 200 µL fosfatnog pufera i obojeno JC-1 (15,4 µM finalno) u toku 15 minuta na 37 °C. Posle ispiranja, uzorci ćelija analizirani su na protočnom citometru FACS Calibur Becton Dickinson korišćenjem kompjuterskog programa *Cell Quest* (BD Biosciences, San Diego, CA, SAD).

JC-1 boja pokazuje potencijal-zavisnu akumulaciju u mitohondrijama, pri čemu fluorescentna emisija na 529 nm (zelena svetlost) ukazuje na monomerni oblik probe, koja prelazi u crvenu svetlost (590 nm) usled formiranja J-agregata. Shodno tome, depolarizacija mitohondrijske membrane je indikovana smanjenjem odnosa intenziteta crvene/zelene svetlosti.

3.3.6. Merenje nivoa slobodnih radikala

Uticaj ispitivanih imunomodulatora na generisanje mitohondrijskog superoksida određen je bojenjem ćelija MitoSox Red fluorescentnom bojom. Ćelije su kultivisane i tretirane

ispitivanim jedinjnjima dok su netretirane ćelije predstavljale kontrolni uzorak. Posle perioda inkubacije u trajanju 24 i 48 h, ćelije su sakupljene, isprane dva puta fosfatnim puferom (PBS), resuspendovane u (5 μ M finalno) MitoSox Red i inkubirane na 37 °C 15 minuta na tamnom mestu. Nivo mitohondrijskog superoksidnog radikala je ispitan na protočnom citometru (FACS Calibur Becton Dickinson). Ekscitaciona talasna dužina bila je 485 nm, a fluorescencija je izmerena na 530 nm. Rezultati su analizirani korišćenjem kompjuterskog programa *Cell Quest* (BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

Generisanje ROS u ćelijama pod uticajem ispitivanih imunomodulatora određeno je korišćenjem ROS osetljive fluorescentne probe 2',7'-dihlordihidrofluorescein-diacetata (DCFH-DA). Sam DCFH-DA nije fluorescentan. Dejstvom unutarćelijskih estera najpre dolazi do hidrolize acetata, a zatim se DCFH oksiduje prisutnim reaktivnim kiseoničnim vrstama do fluorescentnog dihlorfluoresceina (DCF). Ćelije su kultivisane i tretirane ispitivanim jedinjnjem. Netretirane ćelije su predstavljale kontrolni uzorak. Posle perioda inkubacije u trajanju 24 i 48 h, ćelije su sakupljene, isprane dva puta fosfatnim puferom, resuspendovane u 10 mM DCFH-DA i inkubirane na 37 °C 30 minuta u mraku. Nivo unutarćelijskih ROS je ispitan na protočnom citometru (FACS Calibur Becton Dickinson). Ekscitaciona talasna dužina bila je 485 nm, a fluorescencija je izmerena na 530 nm. Rezultati su analizirani korišćenjem kompjuterskog programa *Cell Quest* (BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

3.3.7. Pripremanje ćelijskog lizata za *Western blot* analizu

Proteinski uzorci HTC-116 i HT-29 ćelija su ekstrahovani za *Western blot* analizu 24 h nakon tretmana SFN pri IC50 koncentraciji. Ćelije su isprane dva puta hladnim PBS-om, a zatim lizirane u RIPA puferu, uz dodatak proteaznih i fosfataznih inhibitora. Nakon centrifugiranja na 13000 rpm, 10 min., određena je koncentracija proteina BCA metodom (upotrebom bicinhoninske kiseline) prema uputstvu proizvođača.

Natrijum-dodecil sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) i *Western blot* analiza: Razdvajanje proteina izvodi se na 10% poliakrilamidnom gelu pri denaturišućim uslovima, u prisustvu SDS. Na gel se nanosi 20 μ g ukupnih proteina. Nakon elektroforeze sledi transfer proteina na PVDF membranu. Po završenom blokiranju membrana u TRIS puferu uz dodataka 5% bezmasnog mleka i 0,1% Tween20, membrana se inkubira sa primarnim antitelima (0,1-1 μ g/ml) na 4 °C, preko noći. Zatim sledi inkubacija membrane sa sekundarnim antitelima (1:1000 – 0,2-1 μ g/ml, ili 1:2000) na sobnoj temperaturi 1 h uz neprestano mućkanje. Korišćenjem kita za hemiluminiscenciju detektuju se vezana antitela korišćenjem *Azure Biosystems 600 Imaging* sistema.

3.4. *In vivo* ispitivanje na modelu zebrice

3.4.1. Zebrice

Embrioni zebrica (*Danio rerio*) AB soja (engl. *wild type*) korišćeni su u ovoj doktorskoj disertaciji. U uzgajalištu Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu, gajene su odrasle zebrice pod kontrolisanim uslovima i to, svetlosni režim bio je 14 h dan i 10 h noć, a temperatura je održavana na 28 ± 1 °C. Adultne zebrice su hranjene tri puta tokom dana proteinskom SDS300, lisnatom (*TetraMinFlakes*) i živom (*Artemia salina*) hranom.

3.4.2. Eksperimentalni protokol

Smernice Evropske uredbe (EU2010/86) i Pravilnik za rad sa eksperimentalnim životinjama korišćeni su za pripremu i sprovođenje eksperimenta na modelu zebriće Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Mužjaci i ženke zebrića spremne za mrest, prebačene su u posebne mrestilice u odnosu 1:2. Narednog dana, u ranim jutarnjim satima iniciran je mrest paljenjem svetla. Potom su, prikupljena jaja isprana E3 vodom za uzgoj embriona koja sadrži mM NaCl (ACROS OrganicsTM, SAD), 0,17 mM KCl (Merck, Nemačka), 0,33 mM CaCl₂ · 2H₂O (Merck, Nemačka) i 0,33 mM MgSO₄ · 7H₂O (ACROS OrganicsTM, SAD), kako bi se uklonile nečistoće koje mogu uticati na razvoj embriona. Selekcija oplodjenih jaja vršena je pod svetlosnim mikroskopom (Motic SMZ140 Series, Kina) koja su potom gajena u E3 vodi i inkubatoru (Sanyo MCO-20AIC, Japan) na temperaturi od 28 ± 0,5 °C.

U svako od 24 udubljenja na mikrotitrskoj ploči (Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka) prebačeno je po 10 embriona, potom je odstranjen višak vode, a dodat 1 ml E3 vode kako bi se obezbedili isti eksperimentalni uslovi za sve embrione. Svaka supstanca je testirana u duplikatu (odnosno 2 udubljenja). Stok rastvor SFN je pripremljen u DMSO, dok je PA-MSHA korišćena u svom tečnom obliku. Efekat SFN i PA-MSHA je ispitan u opsegu rastućih koncentracija i to: 0,5, 1, 2, 3, 5, 10 i 20 µg/ml SFN, odnosno 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10% i 20% (0,0018 x 10⁹ ćelija/ml do 0,36 x 10⁹ ćelija/ml) PA-MSHA. Ispitivanje toksičnosti kombinovane primene SFN i PA-MSHA izvršeno je primenom različitih kombinacija prikazanih koncentracija. Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta.

3.4.3. Ispitivanje toksičnosti

Akutna toksičnost ispitivanih imunomodulatora (SFN i PA-MSHA) analizirana je prema OECD test metodi 236 (engl. *Fish Embryo Acute Toxicity Assay*, FET test) u kojoj su korišćeni embrioni stari 6 h posle oplodjenja (engl. *hours post fertilization*, hpf), pri čemu je eksperiment sproveden do stadijuma embriona starosti 120 hpf. Svakog dana, tokom 5 dana trajanja eksperimenta praćeni su efekti imunomodulatora na preživljavanje, razvoj i pojavu teratogenih malformacija, kao i na rad unutrašnjih organa. Takođe, svakodnevnu su uklanjani uginuli embrioni kako bi se sprečio potencijalni negativni uticaj na žive embrione zebrića. Toksičnost je evaluirana na osnovu praćenog letalnog efekta, kao i efekata na rast i razvoj prikazanih u Tabeli 1.

Tabela 1. Toksični efekti ispitivani na embrionima zebrice tokom petodnevnog eksperimenta

Kategorija	Razvojni Proces	Vreme (hpf)				
		24	48	72	96	120
Letalni efekat	Koagulacija embriona ¹	•	•	•	•	•
	Odsustvo somita	•	•	•	•	•
	Odvojenost repa	•	•	•	•	•
	Odsustvo srčanih kontrakcija	•	•	•	•	•
Efekat na rast i razvoj	Malformacija glave embriona	•	•	•	•	•
	Malformacija očiju embriona ²	•	•	•	•	•
	Malformacija otolita/sakula embriona ³	•	•	•	•	•
	Malformacija notohorde embriona	•	•	•	•	•
	Skolioza	•	•	•	•	•
	Malformacija repa embriona ⁴		•	•	•	•
	Edem perikardijalne duplje	•	•	•	•	•
	Promena frekvencije rada srca		•	•	•	•
	Promena cirkulacije krvi		•	•	•	•
	Edem žumancetne kese	•	•	•	•	•
	Deformacija žumancetne kese	•	•	•	•	•
	Nekroza jetre			•	•	•
	Promene u veličini/dužini tela ⁵			•	•	•

¹ Zastoj u organogenezi odnosno razvoju embriona;

² Promene u oku: veličina i oblik;

³ Nepostojanje otolita, odnosno prisustvo više otolita u sakulusu; smanjenje ili povećanje otolita i/ili sakulusa;

⁴ Promene u repu: oblik i/ili položaj;

⁵ Zastoj u razvoju embriona i povećanju njegove veličine, odnosno dužine tela

3.4.4. Modelovanje odnosa koncentracija-odgovor

Procena Benčmark koncentracije/doze (engl. *Benchmark concentration/dose*, BMC, BMD) je metoda koja se koristi u cilju pronalaska uzročno-posledične veze između koncentracije/doze ispitivane supstance i intenziteta efekta/odgovora. Za analizu, korišćen je PROAST web 70.1 (<https://proastweb.rivm.nl/>), javno dostupan softver kreiran po preporukama Naučnog komiteta Evropske agencije za bezbednost hrane (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA (131). Benčmark koncentracija/doza predstavlja statistički izračunati opseg koncentracija/doza koje predviđaju varijacije u intenzitetu toksičnog odgovora (132). Softver matematički obrađuje unete eksperimentalne podatke i izračunava koncentraciju odnosno dozu koja odgovara definisanom nivou odgovora. Definisan nivo odgovora označen je kao BMR (engl. *Benchmark Response*, BMR) koji najčešće iznosi 5% ili 10%, a odgovarajuća Benchmark koncentracija/doza kao BMC, odnosno BMD (133). Prema preporukama EFSA čitav interval pouzdanosti, odnosno donja (BMDL, engl. *BMD lower limit*) i gornja granica pouzdanosti (BMDU, engl. *BMD upper limit*) uzima se kao krajnji rezultat BMD analize (134, 135). Koncentracije SFN i PA-MSHA primenjene u eksperimentu na zebricama analizirane su kao kvantalni podatak pri čemu je prisustvo odnosno odsustvo toksičnog efekta označeno sa 1 odnosno 0. U postupku modelovanja korišćen je BMR od 10%, a broj iteracija unutar analize iznosio je 500 (133). Kao

matematički pristup korišćen je model uprosečavanja (engl. *model averaging*), *Akaike information criterion (AIC)* za odabir optimalnog modela, pre uprosečavanja, iz ponuđenih setova modela tako da *AICmin* modela bude manji za 2 od *AICnull* modela, a *AICmin* bude manji od *AICnull* modela sabranog sa brojem 2 (*null* model ima najveći AIC, nema dozne zavisnosti - efekta i predstavlja se kao $y = a$). Dodatno je posmatran odnos BMDU/BMDL vrednosti i vrednost < 100 je smatrana potrebnom za validnost dobijenih CI pri prikazu modela uprosečavanja.

3.5. In vivo ispitivanje na modelu pacova

3.5.1. Eksperimentalne životinje i dizajn eksperimenta

Tretman životinja i sve eksperimentalne procedure sprovedene su u skladu sa odobrenim protokolom i pravilnikom Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Eksperiment je izveden uz odobrenje Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, (broj etičke dozvole: 323-07-11822/2018-05).

Budući da je imunski odgovor polno specifičan, u sprovedenom eksperimentu korišćeni su mužjaci i ženke *Wistar* pacova (*Rattus norvegicus*) telesne mase 150-200 g, starosti 6 nedelja preuzeti su sa farme za uzgoj eksperimentalnih životinja Vojnomedicinske akademije, Beograd, Srbija. Životinjama su obezbeđeni plastični kavezi zatvoreni žičanom rešetkom u okviru vivarijuma Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. U vivarijumu su kontrolisani svi klimatski uslovi: temperatura vazduha 20-24 °C, relativna vlažnost vazduha 35-60%, pri čemu je ciklus svetlost/mrak programiran na 12 h. Standardna hrana za ishranu laboratorijskih životinja u peletima (smeša za ishranu laboratorijskih životinja, Veterinarski zavod „Subotica”) i voda bili su na raspolaganju *ad libitum* tokom trajanja eksperimenta.

Mušjaci i ženke pacova su nasumično podeljeni u po 10 eksperimentalnih grupa (2 kontrolne sa po 5 životinja). Prvih 7 dana, eksperimentalne životinje su se prilagođavale uslovima u vivarijumu nakon čega je otpočet tretman u trajanju od 28 dana. Mušjaci i ženke pacova tretirani su rastućim dozama SFN, PA-MSHA i njihovom kombinacijom kao što je prikazano u Tabeli 2.

Tabela 2. Eksperimentalni dizajn in vivo studije na pacovima

Eksperimentalna životinja: pacov <i>Wistar</i> soja - mužjaci/ženke (N=5/pol)									
Kontrola - mužjaci/ženke - DMSO									
	SFN 1	SFN 2	SFN 3	PA-MSHA 1	PA-MSHA 2	PA-MSHA 3	MIX 1	MIX 2	MIX 3
Jedinica	mg/kg t.m./dan			ćelija (10^9)/pacov*			mg/kg t.m./dan + ćelija (10^9)		
Doza	0,5	2	5	0,09	0,18	0,36	0,5+0,09	2+0,18	5+0,36
Način primene	oralna gavaža; 1-28 dan			subkutano; jednom nedeljno: 1, 7, 14, 21 dan			SFN: oralna gavaža, 1-28 dan PA-MSHA: subkutano; jednom nedeljno: 1, 7, 14, 21 dan		

*PA-MSHA sadrži $1,8 \times 10^9$ ćelija/ml; eksperimentalnim životinjama je primenjivano subkutano 0,05, 0,1 i 0,2 ml po pacovu što je ekvivalentno 0,09, 0,18 i $0,36 \times 10^9$ ćelija/životinja (pacov)

Najviša doza SFN (SFN 3) korišćena u ovoj doktorskoj disertaciji odabrana je na osnovu doze koja se, za standardizovani ekstrakt SFN, koristi kod ljudi koristeći formulu Američke agencije za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA):

$$SFN\ 3 = doza\ SFN\ koja\ bi\ se\ primenjivala\ kod\ ljudi / 60\ kg * 6,2$$

pri čemu je 60 kg uzeto kao prosečna telesna masa za muškarce i žene, koeficijent 6,2 je koeficijent koji se koristi za ekstrapolaciju doze sa čoveka na pacova (136), dok je doza koja bi se primenjivala kod ljudi preuzeta iz kliničnih istraživanja i iznosi 46,15 mg/dan (137, 138). Na osnovu formule, izračunata je maksimalna doza SFN od 5 mg/kg t.m./dan dok su druge dve doze odabrane na osnovu smernica Pravilnika o metodama ispitivanja opasnih svojstava hemikalija („Službeni glasnik RS”, br. 117/2013). Prema preporukama, raspon između doza treba da bude 2 do 4 puta zbog čega su eksperimentalne životinje u ovoj doktorskoj disertaciji tretirane dozama od 0,5 mg/kg t.m./dan (SFN 1), 2 mg/kg t.m./dan (SFN 2) i 5 mg/kg t.m./dan (SFN 3).

Srednja doza PA-MSHA izračunata je na osnovu gore pomenute formule:

$$Sr.\ doza = doza\ PA - MSHA\ primenjivana\ kod\ ljudi / 60kg * 6,2$$

pri čemu se kod ljudi primenjuje 1 ml PA-MSHA injekcije standardizovan na $1,8 \times 10^9$ ćelije, jednom nedeljno (88). Na osnovu formule, preračunato je da srednja doza PA-MSHA koju pacovi treba da prime $0,18 \times 10^9$ ćelija/ml nedeljno, odnosno iznosi 0,1 ml injekcije nedeljno (PA-MSHA 2). Za maksimalnu koncentraciju uzeta je 2 puta veća vrednost, $0,36 \times 10^9$ ćelija/ml (PA-MSHA 3), dok je za minimalnu uzeta 2 puta manja od srednje vrednosti, odnosno $0,09 \times 10^9$ ćelija/ml (PA-MSHA 1).

Pre primene, SFN je rastvoren u DMSO, a potom je aplikovan pacovima oralnom sondom u jutarnjim časovima, dok je PA-MSHA primenjivan subkutano svakog 7 dana. U toku trajanja eksperimenta unos hrane i vode, kao i telesna masa, beleženi su svakodnevno.

3.5.2. Unos vode i hrane

Tokom eksperimenta unos vode i hrane beležen je svakodnevno u svim eksperimentalnim grupama, dok je unos vode i hrane za svaku pojedinačnu životinju računat prvog, sedmog, četrnaestog, dvadestprvog i dvadestosmog dana eksperimenta i to korišćenjem sledeće formule:

$$Unos\ vode/hrane = ukupan\ unos\ u\ grupi / (t.\ m./sr.\ vred.\ t.\ m.) / 5$$

pri čemu je ukupan unos vode odnosno hrane u grupi izračunat tako što je od 250 ml vode odnosno 200 g hrane koju su životinje dobijale svakodnevno oduzeta preostala količina vode odnosno hrane. Telesnu masu pojedinačne životinje predstavljena je kao t.m., dok se sr. vred. t.m. odnosi na srednju vrednost telesnih masa životinja u grupi u trenutku merenja (1, 7, 14, 21, odnosno 28. dana).

3.5.3. Prirast telesne mase i relativna masa organa

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

$$BWG = (mf - mi)/mi$$

pri čemu je *mf* finalna telesna masa eksperimentalne životinje, a *mi* inicijalna telesna masa, odnosno masa na početku eksperimenta.

Relativna masa organa izračunata je tako što je izmerena masa organa podeljena sa telesnom masom životinja na kraju eksperimenta i predstavlja neimenovani broj.

3.5.4. Uzorci i priprema za analizu

Dvadesetdevetog dana eksperimenta izvršeno je žrtvovanje životinja bez nanošenja bola, patnje i stresa i to intraperitonealnim (i.p.) aplikovanjem anestetika, 300 mg/kg t.m. ketamina i 30 mg/kg t.m. ksilazina. Uzorci krvi sakupljeni su kardijačnom punkcijom i dalje pripremljeni za analizu biohemijskih i hormonskih parametara i to sakupljanjem u vakutejnere za izdvajanje seruma. Centrifugiranjem u trajanju od 30 min na 3000x g izdvojen je serum, koji je potom zamrznut na -20 °C i čuvan do momenta izvođenja analiza. Pored toga, puna krv odvojena je za određivanje hematoloških parametara korišćenjem heparinskih vakutejnera, dok je plazma korišćena za analizu parametara oksidativnog stresa. Od organa, izolovani su bubrezi, jetra, pluća, slezina, srce i timus koji su korišćeni za određivanje parametara oksidativnog stresa u tkivima, kao i za histološke analize. Uzorci tkiva za patohistološku analizu su fiksirani korišćenjem neutralnog 10% puferisanog formaldehida (pH 6,8), dok su uzorci tkiva za analizu parametara oksidativnog stresa zamrznuti u tečnom azotu i čuvani na -80 °C do momenta izvođenja eksperimenata.

Za pripremu homogenata tkiva, prvo su nepotpuno odmrznuti uzorci tkiva na ledu (0-4 °C), a nakon toga je na homogenizatoru (T10 basic ULTRA-TURRAX, IKA, Nemačka) izvršena homogenizacija 0,2-0,4 g uzorka u prethodno pripremljenom hladnom fosfatnom puferu. Korišćen je 0,1 mol/l fosfatni pufer sa 1,15% KCl u odnosu 1:9 (v/v) čiji je pH 7,4. Homogenati su centrifugirani su na +4 °C na 10000x g tokom 15 minuta. Izdvojeni postmitohondrijalni supernatant prebačen je u ependorf tube i dalje korišćen za određivanje proteina, kao i parametara oksidativnog stresa, odnosno antioksidativne zaštite.

3.5.5. Određivanje hematoloških parametara

Analizator marke MYTHIC (*Orphee Medical*, Ženeva, Švajcarska) i komercijalni reagensi korišćeni za analizu hematoloških parametara tretiranih životinja i kontrole i to: određivanje broja leukocita i leukocitarne formule, kao i procenta ovih ćelija u odnosu na ukupan broj leukocita. Takođe, određeni su parametri anemije: broj eritrocita, koncentracija hemioglobina, hematokrit, srednji volumen eritrocita (engl. *mean corpuscular volumen*, MCV), srednji sadržaj hemioglobina u eritrocitu (engl. *mean corpuscular hemoglobin*, MCH), srednja koncentracija hemioglobina u eritrocitu (engl. *mean corpuscular hemoglobin concentration*, MCHC) i broj trombocita.

3.5.6. Određivanje biohemijskih parametara

Za određivanje biohemijskih parametara korišćen je analizator marke Cobas C311 (Diagnostics Roche, Bazel, Švajcarska) i komercijalni reagensi. U ovoj doktorskoj disertaciji od biohemijskih parametara u uzorcima seruma tretiranih životinja i kontrole analizirani su: 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, gvožđe u serumu, kalcijum (Ca²⁺), neorganski fosfor (PO₄³⁺), magnezijum (Mg²⁺) i hloridi (Cl⁻), kao i

aktivnost enzima: aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT) i alkalne fosfataze (ALP).

3.5.7. Određivanje nivoa hormona

Komercijalni reagensi za elektro-hemiluminiscentni imunoesej (ECLIA) iskorišćeni su za određivanje nivoa hormona u serumu životinja uz pomoć Cobas E411 analizatora (Diagnostics Roche, Bazel, Švajcarska). Izmerene su koncentracije: testosterona, trijodtironina (T3), tiroksina (T4), kao i slobodnog trijodtironina (FT3) i tiroksina (FT4).

3.5.8. Analiza produkcije proteina

Uticaj primenjenog tretmana na produkciju proteina određen je korišćenjem ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) kitova marke FineTest (Wuhan Fine Biotech Co., Wuhan, Kina). U svako udubljenje na ELISA ploči dodato je 100 µL uzorka (plazma ili supernatant homegenata tkiva) i potom izvršena inkubacija na 37 °C u trajanju od 90 min. Nakon toga, ploča je ispirana dva puta rastvorom za ispiranje i dodato je 100 µL antitela specifičnog za protein i obeleženog biotinom, nakon čega je ploča ponovo inkubirana na 37 °C, 60 min. Usledilo je ponovno ispiranje i dodavanje 100 µL streptavidin-konjugata za koji će se vezati TMB substrat koji omogućava bojenje u plavo. Nakon inkubacije od 10-20 min na 37 °C, reakcija se zaustavlja dodavanjem stop reagensa i očitava se apsorbancija na 450 nm. Izmerena je produkcija citokina, hemokina, i proteina i to: interferona-gama (IFN γ), interleukina-2 (IL-2), interleukina-6 (IL-6), interleukina-10 (IL-10), faktor nekroze tumora-alfa (TNF α), transformišućeg faktora rasta-beta (TGB β), hemiokin liganda 1 (CXCL1), kao i nuklearnog eritroidnog faktora-2 (Nrf2) i hem oksigenaze 1 (HO-1), a potom je njihova koncentracija izračunata korišćenjem prethodno napravljenih standardnih kriva.

3.5.9. Određivanje parametara oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite

U plazmi i homogenatima tkiva određeni su sledeći parametri oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite: ukupan nivo glutationa (GSH), prisustvo ishemijom modifikovanog albumina (IMA), aktivnost enzima superoksid dismutase (SOD), malondialdehid (MDA) i ukupne sulfhidrilne grupe (SHG) nakon izlaganja SFN, PA-MSHA i njihovoj kombinaciji u toku 28 dana. Reagensi korišćeni u ovom eksperimentu bili su analitičkog stepena čistoće, nabavljeni iz komercijalnih izvora. Svi parametri oksidativnog stresa mereni su na spektrofotometru SPECTROstar Nano UV/VIS spektrometra (BMG Labtech, Ortenberg, Nemačka), kreirane su kalibracione krive iz kojih je izračunata koncentracija markera oksidativnog stresa / antioksidativne zaštite.

Nivoi redukovano GSH mereni su u tretiranim i netretiranim uzorcima spektrofotometrijskom metodom. U 200 µL uzorka dodaje se 200 µL 5% sulfosalicilne kiseline (SSA) i potom se vrši vorteksiranje i centrifugiranje na +4 °C, 10000x g u trajanju od 15 minuta. Nakon toga, izdvojeni supernatant prenosi se na mikrotitar ploču pri čemu se u svaki bunarić dodaje 25 µL *ex tempore* pripremljenog reagensa, 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeve kiseline (DTNB) i 200 µL 0,3M Na₂HPO₄.

Da bi se odredio nivo ishemije na osnovu nivoa IMA, u 35 µL uzorka dodato je 10 µL reagensa, odnosno kobalt-hlorid (CoCl₂). Tako pripremljen uzorak inkubiran je 10 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se izvršilo vezivanje kobalta za albumin. Nakon toga, dodato

je 10 μ L kolorimetrijskog indikatora, ditiotreitol (DTT). Bojena reakcija je zaustavljena nakon 2 minuta uz pomoć fiziološkog rastvora. Apsorbancija je očitana na 470 nm.

Za određivanje MDA spektrofotometrijskom metodom, prvo se uzorak pomeša sa TBA reagensom (0,917 mmol/l trihlorsirćetna kiselina i 2,6 mol/L tiobarbiturna kiselina) i kratko vorteksira. Nakon toga sledi inkubacija u trajanju od 5 minuta na vodenom kupatilu zagrejanom na 100 °C, i 10. minuta hlađenja u rashlađenoj vodi. Uzorci se potom prenose u ependorf tube i centrifugiraju pod sledećim uslovima: 4 °C, 10000× g, 10 minuta. Potom se 250 μ L supernatanta pipetira na ploču i meri se apsorbancija na 535 nm. Uporedo sa analizama pripremljeni su i standardni rastvori MDA pomoću kojih je konstruisana kalibraciona kriva opsega 1-10 μ mol/l.

Nivoi ukupnih SH određeni su pomoću spektrofotometrijske metode koja se zasniva na reakciji između alifatičnih tiola (SH grupa) u baznoj sredini (fosfatni pufer, pH 9,0) i DTNB kao reagensom. U reakciji nastaje žuto obojen p-nitrofenol čiju je apsorbanciju moguće meriti na 412 nm.

Superoksid dismutaza inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u baznoj sredini (pH 10,2) što je iskorišćeno za određivanje aktivnosti ovog enzima u tkivima tretiranih i netretiranih životinja. Aktivnost se izražava u jedinici U/g koja ukazuje na količinu enzima potrebnog za 50% inhibicije autooksidacije adrenalina. U reakciji između SOD i adrenalina nastaje crveni proizvod čija se apsorbancija meri na 480 nm bez prisustva SOD (kontrola) i u prisustvu SOD (analiza), pri čemu se apsorbancija očitava na svaki minut. Dobijana vrednost SOD množi se sa 150 i deli sa masom ukupnih proteina u tkivu kako bi se dobila konačna aktivnost SOD u pojedinačnom uzorku.

3.5.10. Patohistološka analiza tkiva

Patohistološka analiza sprovedena je na Veterinarskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Uzorci tkiva jetre, slezine i timusa su nakon fiksacije, dehidrirani, prosvetljeni u ksilolu i uklopljeni u parafin u skladu sa standardnom laboratorijskom procedurom. Parafinski kalupi su serijski sečeni na debljinu od 5 μ m korišćenjem rotacionog mikrotoma (Reichert, Beč, Austrija). Preseci tkiva jetre bojeni su hematoksilinom i eozinom (H/E), perijodnom kiselinom i Schiffovim reagensom (PAS) i Masson Goldner kompletom (MG) (MerckMillipore, Darmstadt, Nemačka), dok su uzorci slezine i timusa bojeni samo H/E. Preseci su montirani korišćenjem DPX medijuma za montiranje (FisherScientific, Lufbra, Ujedinjeno Kraljevstvo) i posmatrani standardnim mikroskopom (Olympus CX31) koji je opremljen digitalnom kamerom (UC50 Soft Imaging Solutions) i povezan sa odgovarajućim softverom (SensEntry1.13, Munster, Nemačka). Preseci tkiva jetre koji su obojeni PAS korišćeni su za procenu depozicije glikogena (Gly) u hepatocitima, dok su se preseci obojeni H/E i MG koristili za procenu intenziteta mikroskopskog oštećenja. Prilikom procene mikroskopskog oštećenja tkiva jetre ocenjivani su sledeći parametri: hepatociti sa eozinofilnom citoplazmom (EH), steatoza (Ste), citoplazmatska vakuolizacija (CV) i kongestija (Con). Depozicija glikogena i svi pomenuti parametri procenjivani su semikvantitativno i bodovani kao 0 (odsutno), 1 (blago), 2 (umereno) i 3 (teško). Ukupna ocena mikroskopskog oštećenja izračunata je sabiranjem svih pomenutih parametara, i potom deljenjem sa 4. Pored navedenih parametara na preparatima tkiva jetre obojenih MG procenjivano je i eventualno prisustvo fibroze.

Na preparatima tkiva slezine bojenih H/E ispitana su i ocenjena odvojeno dva glavna funkcionalna odeljka, crvena i bela pulpa. Ocenjivanje je sprovedeno na osnovu preporuka uz sledeća prilagođavanja: U beloj pulpi, koja se sastoji od periarterijskog limfocitnog

omotača (PALS), limfnih folikula (LF) i marginalnih zona (MZ), sve strukture su ispitane odvojeno. Promene celularnosti u pogledu broja limfocita (Ly) procenjujane su u sve tri navedene komponente bele pulpe, promene u veličini struktura procenjujane su za PALS i MZ, dok su promene u broju prisutnih struktura procenjujane su za PALS i LF. Takođe je procenjuvan razvoj germinativnog centra u LF. U crvenoj pulpi su ocenjujane promene u njenoj veličini i celularnosti u pogledu broja Ly i hematopoetskih ćelija (HC). Promene u svim gore navedenim kriterijumima procenjuvani su semikvantitativno i ocenjuvani kao 0 (normalno), 1/-1 (blago povećano/smanjeno), 2/-2 (umereno povećano/smanjeno) i 3/-3 (izrazito povećano/smanjeno).

Na presecima timusa bojenim H/E izvršena je rutinska histološka analiza koja je podrazumevala praćenje prisustva sledećih parametara: amiloida, apoptoze limfocita, atrofije, cista, hemioragija, hiperplazije epitelnih ćelija, inflamacije, znakova involucije, mineralizacije tkiva, nekroze limfocita i pigmenata.

3.5.11. Modelovanje odnosa doza-odgovor

Benčmark interval pouzdanosti izračunat je kao što je objašnjeno u poglavlju 3.4.4. Analizirani parametri dobijeni u eksperimentu na pacovima predstavljani su kao kvantitativni, kontinuirani podaci za svaku pojedinačnu varijablu. Analiziran je odnos doza-efekat odgovor za svaku dozu SFN, odnosno PA-MSHA, pojedinačno i u kombinaciji, primenjenu u eksperimentu na pacovima, dok su kao efekat, posmatrane vrednosti izmerenih hematoloških i biohemijskih parametara, hormona u serumu, citokina, hemiokina i proteina, kao i vrednosti parametara oksidativnog stresa odnosno antioksidativne zaštite. Kao BMR, tj. veličina efekta za izračunatu dozu, uzeta je vrednost 5% prema preporukama softvera i EFSA za kontinuirane podatke pri nivou pouzdanosti od 90%, dok je broj iteracija postavljen na 200. Kao matematički pristup korišćen je model uprosečavanja (engl. *model averaging*) pri čemu je odnos BMDU/BMDL < 100 usvojen kao kriterijumi za validnost dobijenih rezultata.

3.5.12. Statistička obrada podataka

Statistička obrada rezultata izvršena je pomoću Graph Pad Prism 8.0 softvera (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, SAD), pri čemu su podaci prvo testirani na normalnost raspodele upotrebom Shapiro Wilk testa, a potom su srednje vrednosti između grupa poređene korišćenjem jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) praćene post-hoc Fišerovim testom (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost (SV) i standardna devijacija (SD). U slučajevima kada ispitivani parametri u grupi ne prate normalnu raspodelu, korišćen je Kruskal-Walli's test praćen Dunn post-hoc testom, a dobijeni rezultati predstavljani su kao medijana i opseg (minimum-maksimum). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa ponovljenim merenjem i LSD post hoc testom (engl. *Least Significant Difference*, LSD) korišćena je za poređenje promena srednjih vrednosti između kontrole i eksperimentalnih grupa u više vremenskih perioda (1, 7, 14, 21. i 28. dana) tokom trajanja eksperimenta, a rezultati su predstavljani kao SV i SD. Softver graph Pad Prism 8.0 je takođe korišćen za grafički prikaz rezultata. Značajnost je prihvaćena za $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. *In silico* analiza

4.1.1. Predviđanje toksičnosti sulforafana

Prvi korak *in silico* analize bio je predviđanje potencijalnih toksičnih efekata SFN na osnovu njegove hemijske strukture. Hemijska struktura D,L-SFN učitana je u *Derek Nexus* softver u SMILES formatu (CS(=O)CCCCN=C=S). Prepoznate su 2 toksofore u molekulu, izocijanat i izotiocijanat (Prilog 1, Slika 1). Ove hemijske grupe predstavljaju upozorenja u strukturi SFN i mogu biti odgovorne za pojavu sledećih potencijalnih toksičnih efekata: *in vitro* oštećenje hromozoma kod sisara, *in vitro* mutagenost kod bakterija i osetljivost kože (senzibilizacija) kod sisara. Nivo dokaza za predviđene efekte je uverljiv (engl. *plausible*) što znači da su ovi nalazi verovatno tačni i validni, odnosno da postoji dovoljan broj literaturnih podataka koji opisuju vezu između izocijanata ili izotiocijanata i identifikovanih toksičnih efekata. Daljom *in silico* analizom ispitani su potencijalni molekularni mehanizmi koji mogu doprineti oštećenju hromozoma, mutagenosti ili osetljivosti kože, ali i pojavi drugih toksičnih efekata vezanih za primenu SFN.

4.1.2. Toksikogenomička analiza sulforafana

Uticaj SFN na ekspresiju gena ispitan je pomoću CTD baze podataka, gde je utvrđeno da SFN interaguje sa ukupno 1933 gena i ostvaruje 2924 interakcije (decembar, 2023), pri čemu najveći broj interakcija ostvaruje sa genima uključenim u mehanizme antioksidativne zaštitne i proces inflamacije, i to: *NFE2L2*, *NQO1*, *HMOX1*, *GCLC*, *IL1B*, *TXNRD1*, *IFNG*, *TNF*, *GCLM*, *AGT*. Ovi podaci preuzeti su iz *Gene* kartice, CTD baze podataka. Uz pomoć *Chemical-gene Interaction Query* dodatka određen je tip interakcija između pomenutih gena i SFN na različitim nivoima ekspresije, pri čemu je identifikovano 3 vrsta interakcija: ekspresija mRNK, ekspresija proteina i aktivnost proteina. U obzir su uzete samo binarne interakcije (jedan gen-jedna hemikalija), dok su višekomponentne isključene iz daljeg razmatranja. U Tabeli 3 sumiran je broj i vrsta interakcija između SFN i 10 gena za koje postoji najveći broj dokaza (literaturnih podataka), kao i najznačajniji metabolički procesi regulisani datim genima. Strelice nadole označavaju inhibiciju navedenih procesa, dok strelice nagore označavaju stimulaciju. Obe tendencije mogle su se uočiti u slučaju pojedinih interakcija.

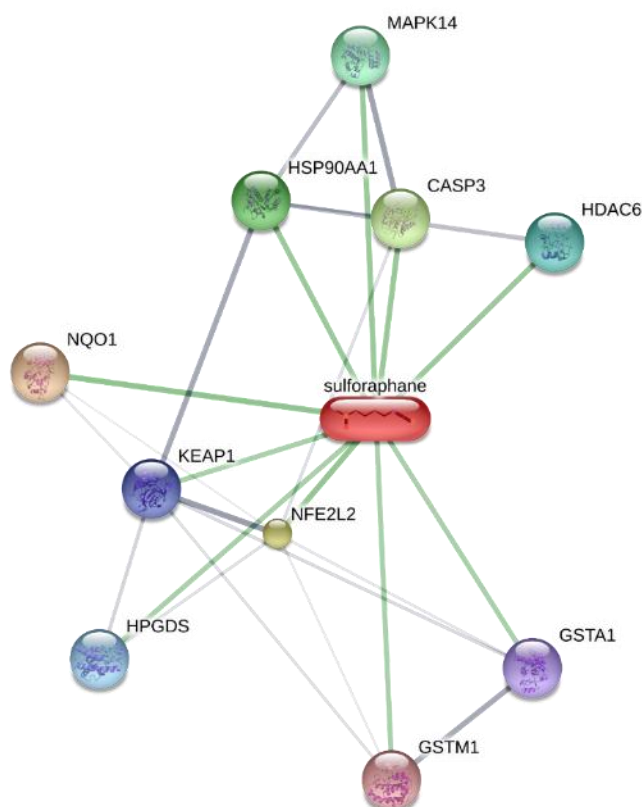
Tabela 3. Broj i vrsta interakcija između gena i sulforafana (CTD; <https://ctdbase.org/>) i metabolički procesi regulisani datim genima

Gen*	Oznaka	Broj interakcija	Vrsta interakcije	Metabolički proces*
Nuklearni faktor 2 sličan eritroidu	<i>NFE2L2</i>	296	↑ ekspresija mRNK ↑ ekspresija proteina ↑ aktivnost proteina	Oksidativni stres
NAD(P)H dehidrogenaza	<i>NQO1</i>	149	↑ ekspresija mRNK ↑ ekspresija proteina ↑ aktivnost proteina	Oksidativni stres
Hem oksigenaza 1	<i>HMOX1</i>	101	↑ ekspresija mRNK ↑ ekspresija proteina ↑ aktivnost proteina	Oksidativni stres
Gama-glutamilcistein sintetaza	<i>GCLC</i>	37	↑ ekspresija mRNK ↓ ekspresija mRNK ↑ ekspresija proteina ↑ aktivnost proteina	Oksidativni stres
Interleukin-1B	<i>IL1B</i>	34	↓ ekspresija mRNK ↓ ekspresija proteina ↓ aktivnost proteina	Inflamacija
Tioredotsin reduktaza 1	<i>TXNRD1</i>	34	↑ ekspresija mRNK ↓ ekspresija mRNK ↑ ekspresija proteina ↑ aktivnost proteina ↓ aktivnost proteina	Oksidativni stres
Interferon gama	<i>IFNG</i>	28	↓ aktivnost proteina	Inflamacija
Faktor nekroze tumora-alfa	<i>TNF</i>	21	↑ ekspresija mRNK ↓ ekspresija mRNK	Inflamacija
Glutamat-cistein ligaza	<i>GCLM</i>	20	↑ ekspresija mRNK ↓ ekspresija mRNK ↑ ekspresija proteina	Oksidativni stres
Angiotenzinogen	<i>AGT</i>	19	/	Regulacija KP +

*podaci preuzeti iz GeneCards baze podataka (<https://www.genecards.org/>); + KP: krvni pritisak

Dodatno, u okviru *Disease* kartice CTD baze identifikovane su 1803 bolesti koje se povezuju sa SFN, među kojima je 28 bolesti za koje je pokazano da SFN ima potencijalni terapijski efekat kao što su, na primer: kardiomiopatija, dijabetesna nefropatija, inflamatorne bolesti, akutno oštećenje bubrega, dermatitis, disfunkcija i remodelovanje srčanih pretkomora, kao i jedna (trovanje) koje može biti posledica primene SFN. Veze između SFN i ostalih identifikovanih bolesti predstavljaju proizvod deduktivnog zaključivanja, odnosno povezuju SFN sa nastankom bolesti posredstvom gena na koje on deluje. Drugim rečima, ukoliko SFN utiče na ekspresiju gena uključenih u nastanak određene bolesti, CTD baza stvara link/vezu između SFN i date bolesti. Kako *in silico* analiza služi za usmeravanje daljih *in vitro* i *in vivo* testova toksičnosti, posmatrane su samo bolesti za koje postoji direktna veza.

Rezultati interakcije SFN i gena dalje su potvrđeni korišćenjem STITCH baze. Ova baza formira i mrežu SFN-protein interakcija koje su označene zelenom bojom. Debljina veze pokazuje jačinu asocijacije, dok sive linije predstavljaju vezu između intereagujućih proteina (Slika 1).



Slika 1. Mreža interakcija SFN i proteina (STITCH, <http://stitch.embl.de/>)

Zelena boja: veza hemikalija-protein; siva boja: veza protein-protein

Detaljan prikaz predviđenih SFN-protein interakcija dat je u Tabeli 4. Skor ukazuje na potencijal SFN da promeni ekspresiju i/ili aktivnost proteina. Vrednosti bliže jedinici sugerišu veću verovatnoću za nastanak interakcije.

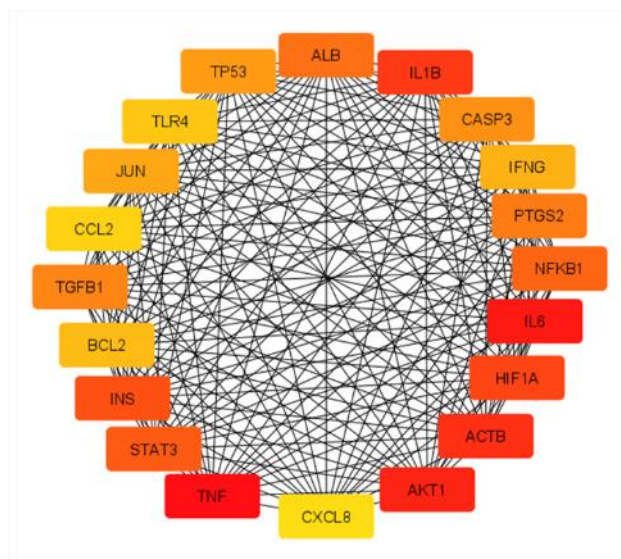
Tabela 4. Sulforafan-protein interakcije preuzete iz STITCH baza podataka (<http://stitch.embl.de/>)

Protein	Oznaka	Skor
NAD(P)H dehidrogenaza	NQO1	0,989
Nuklearni faktor 2 sličan eritroidu	NFE2L2	0,978
Kaspaza 3	CASP3	0,947
Protein toplotnog šoka AA1	HSP90AA1	0,943
Mitogenom aktivirana protein kinaza 14	MAPK14	0,943
Histon deacetilaza 6	HDAC6	0,943
Prostaglandin D sintaza	HPGDS	0,874
KEAP1 protein (engl. <i>Kelch-Like ECH-Associated Protein 1</i>)	KEAP1	0,872
Glutation S-transferaza alfa 1	GSTA1	0,869
Glutation S-transferaza mi 1	GSTM1	0,869

Kao što je i očekivano, SFN inteeaguje sa proteinima čija je funkcija antioksidativna zaštita u ćelijama, pre svega sa NQO1 i NRF2, ali i sa KEAP1 proteinom koji reguliše aktivnost NRF2. Takođe, SFN direktno utiče na dva oblika glutation S-transferaze, alfa 1 i

mi 1. Bitno je istaći i da SFN interaguje sa CASP3 i MAPK14, proteinima uključenim u proces programirane ćelijske smrti, apoptoze.

Budući da SFN reguliše veliki broj gena, prioritizacija, odnosno određivanje najznačajnijih gena iz unetog seta gena, sprovedeno je pomoću *Cytoscape* dodatka *CytoHubba* koji korišćenjem matematičkih metoda rangira gene/proteine iz mreže na osnovu njihove značajnosti, odnosno omogućava generisanje nove mreže interakcija koja predstavlja glavnu mrežu sačinjenu od 20 najznačajnijih gena na koje deluje SFN, kao i na proteine koje kodiraju ti geni. Sprovedena analiza, potvrdila je značajnu vezu između SFN i gena/proteina uključenih u proces apoptoze, imunskog odgovora i oksido-reduktivnih reakcija (Slika 2). Izdvojeni geni/proteini dalje su korišćeni za analizu genske onotologije.



Slika 2. Dvadeset najznačajnijih sulforafan-intereagujućih gena/proteina rangiranih pomoću *Cytoscape* *CytoHubba* alata, MCC metodom (engl. Maximal Clique Centrality, MCC)

Intenzitet boje čvorova u mreži (gena/proteina) korelira sa njihovom značajnošću, pri čemu žuta predstavlja najnižu, a crvena najvišu značajnost gena/proteina

4.1.3. Genska ontologija sulforafan-intereagujućih gena

Analiza ontologije gena sprovedena je u cilju razumevanja funkcije gena i njihovih međusobnih odnosa, odnosno kako geni doprinose biološkim procesima, molekularnim funkcijama i ćelijskim komponentama. Biološki procesi se dešavaju unutar ćelije ili organizma, poput ćelijske deobe, metabolizma ili odgovora na stres, dok su molekularne funkcije specifične aktivnosti koje obavljaju pojedinačne molekule kao što su proteini (vezivanje DNK, enzimska aktivnost, transport jona i mnoge druge). Konačno, ćelijske komponente su delovi ćelijske strukture ili organele, poput ćelijske membrane, jedra, mitohondrija ili ribozoma, gde se odvijaju različiti biološki procesi (120).

Funkcionalna analiza (ontologija) SFN-intereagujućih gena sprovedena je, uz pomoć *Cytoscape* BINGO dodatka kojim je identifikovano 1419 procesa, a 10 najznačajnijih je prikazano u Tabeli 5. Potom su biološki procesi i molekularni putevi ispitani pomoću *Cytoscape* dodatka ClueGO + CluePedia, a potvrđeni primenom DAVID alata.

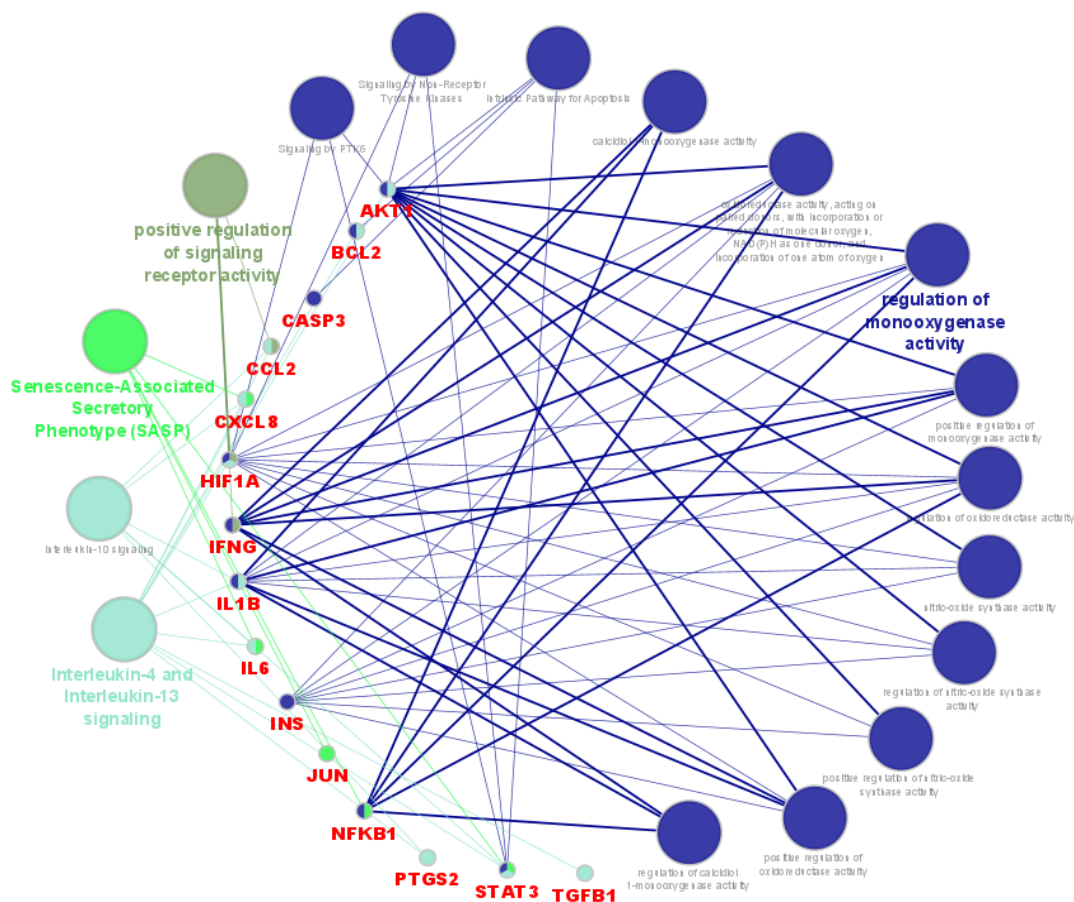
Tabela 5. Deset najznačajnijih bioloških procesa regulisanih sulforafan-intereagujućim genima dobijeni korišćenjem Cytoscape BINGO alatke (<https://apps.cytoscape.org/apps/bingo>)

ID biološkog procesa	Naziv	p vrednost	Geni
9611	Proces zarastanja rana	3,49e ⁻¹²	CXCL8, TGFB1, STAT3, HIF1A, NFKB1, INS, IL6, CASP3, IL1B, BCL2, AKT1, CCL2, TLR4
6950	Odgovor na stresore	4,89e ⁻¹²	JUN, CXCL8, TGFB1, STAT3, PTGS2, HIF1A, NFKB1, INS, IL6, IFNG, CASP3, IL1B, ALB, BCL2, AKT1, CCL2, TLR4
6952	Odbrambeni odgovor organizma	4,89e ⁻¹²	CXCL8, TGFB1, STAT3, HIF1A, NFKB1, INS, IL6, IFNG, IL1B, BCL2, AKT1, CCL2, TLR4
6954	Inflamatorni odgovor	4,89e ⁻¹²	IL6, CXCL8, TGFB1, IL1B, STAT3, AKT1, CCL2, HIF1A, TLR4, NFKB1, INS
42981	Regulacija apoptoze	4,89e ⁻¹²	JUN, TGFB1, PTGS2, NFKB1, INS, IL6, IFNG, CASP3, IL1B, ALB, BCL2, AKT1, CCL2, TLR4
43067	Regulacija programirane ćelijske smrti	4,89e ⁻¹²	JUN, TGFB1, PTGS2, NFKB1, INS, IL6, IFNG, CASP3, IL1B, ALB, BCL2, AKT1, CCL2, TLR4
10941	Regulacija ćelijske smrti	4,89e ⁻¹²	JUN, TGFB1, PTGS2, NFKB1, INS, IL6, IFNG, CASP3, IL1B, ALB, BCL2, AKT1, CCL2, TLR4
51094	Pozitivna regulacija razvojnog procesa	8,61e ⁻¹²	JUN, IL6, TGFB1, IFNG, IL1B, BCL2, AKT1, PTGS2, HIF1A, NFKB1, INS
51716	Ćelijski odgovor na stimuluse	2,29e ⁻¹¹	JUN, CXCL8, TGFB1, STAT3, HIF1A, IL6, IFNG, CASP3, IL1B, ALB, BCL2, AKT1, CCL2, TLR4
9605	Odgovor na eksterne stimuluse	2,46e ⁻¹¹	JUN, IL6, CXCL8, TGFB1, IFNG, IL1B, ALB, BCL2, AKT1, CCL2, PTGS2, TLR4

Izdvojenim setom gena pokreće se niz reakcija u organizmu čiji je krajnji efekat aktivacija i/ili inhibicija jednog od 4 identifikovana klastera:

- Klaster 1: regulacija monooksigenazne aktivnosti koja obuhvata 76,47% identifikovanih puteva
- Klaster 2: interleukin-4 i interleukin-13 signalni put koji obuhvata 11,76% identifikovanih puteva
- Klaster 3: pozitivna regulacija aktivnosti signalnih receptora koja obuhvata 5,88% identifikovanih puteva
- Klaster 4: sekretorni fenotip povezan sa starenjem koji obuhvata 5,88% identifikovanih puteva

Rezultati ove analize prikazani su na slici 3.



Slika 3. Identifikovani molekularni putevi sulforafan-intereagujućih gena

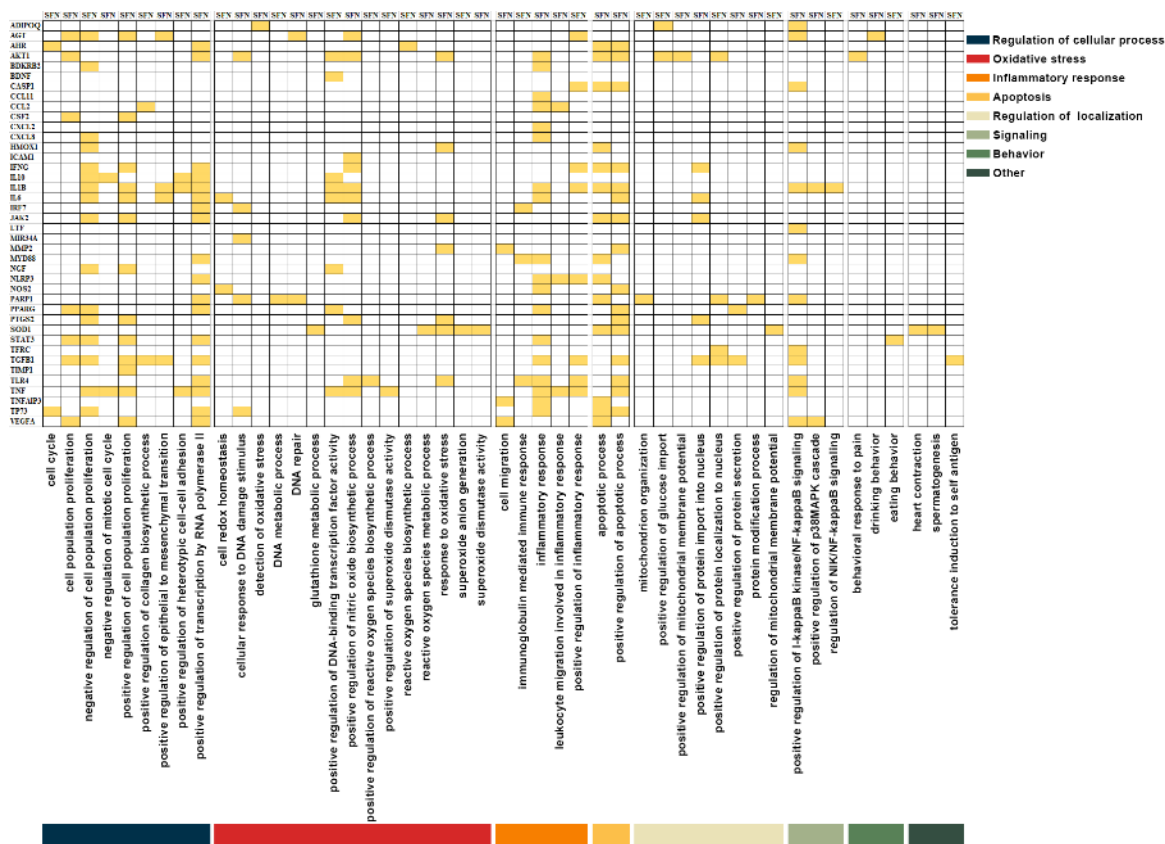
Veličina čvorova ukazuje na procenat gena iz skupa uključenih u regulaciju svakog molekularnog puta; boja ukazuje na povezanost gena sa klasterom (Cytoscape ClueGo + CluePedia: baze podataka KEGG, *Reactome* i *WikiPathways* su odabrane za analizu puteva kao i dvofazni hipergeometrijski statistički test sa Bonferroni step-down korekcijom i κ vrednošću 0,3)

Konačno, korišćenjem istih baza podataka i statističkih testova, DAVID alatom identifikovano je 34 klastera, među kojima je interleukinski signalni put čiji je skor 11,75, zatim signalni putevi pokrenuti infekcijom (skor 8,72), kao i odgovor na zarastanje rana (skor 6,71). Stoga, naredne *in silico* analize bile su usmerene ka detaljnijem ispitivanju uticaja SFN na imunski sistem.

4.1.4. Uticaj sulforafana na imunski sistem

U cilju boljeg razumevanja SFN-imunski odgovor relacije, korišćena je nova funkcija CTD baze, *CTD Tetramers* (engl. *ChemicalGenePhenotypeDisease-tetramers*, CGPD-tetramer) koja omogućava formiranje veze između hemikalije i bolesti preko hemikalija-gen i gen-fenotip interakcija. Na ovaj način, moguće je ispitati vezu između SFN (hemikalija) i inflamatornih bolesti (bolest) kako bi se detaljnije istražili mehanizmi imunskih odgovora indukovani SFN. Otkriveno je ukupno 215 tetramera povezanih sa SFN i inflamacijom preko 40 gena i 48 fenotipa. Većina identifikovanih fenotipova grupisana je u 7 kategorija na osnovu zajedničkih gena (Slika 4) i to: regulacija ćelijskog ciklusa (67 tetramera formirana kroz 9 fenotipa i 27 gena), oksidativni stres (43 tetramera: 15 fenotipa i 24 gena), inflamatorni odgovor (35 tetramera: 5 fenotipa i 24 gena), apoptoza (30 tetramera: 2 fenotipa i 22 gena), regulacija ćelijske lokalizacije (17 tetramera: 8 fenotipa i 11 gena),

regulacija ćelijske signalizacije (16 tetramera: 3 fenotipa i 13 gena) i ćelijski odgovor na stimulus (3 tetramera: 3 fenotipa i 3 gena), dok su preostala 3 fenotipa (kontrakcija srca, spermatogeneza i tolerancija na auto-antigene) uključena u generisanje 3 tetramera posredstvom *SOD1* i *TGFB1* gena.



Slika 4. Matrica CGPD-tetramera

Veza između sulforafana i inflamacije; 215 identifikovanih CGPD-tetramera predstavljenih kroz matricu, raspoređeni po zajedničkim genima i fenotipovima. Ukupno 40 gena (šrafirani pravougaonici) i 48 fenotipova grupisano u 7 kategorija povezuju sulforafan sa inflamacijom

4.1.5. Predviđanje toksičnih efekata sulforafana na nivou gena

Sprovedene *in silico* analize iskorišćene su i za predviđanje potencijalno toksičnih efekata SFN kod pacijenata obolelih od karcinoma kolona, pankreasa i prostate.

Prvi korak podrazumevao je da se identifikuju različito eksprimirani geni (engl. *Differentially Expressed Genes*, DEG) u tkivima karcinoma. U GEO bazi podataka za analizu ekspresije gena u karcinomu kolona, odabrana su tri skupa, GSE41258 i GSE68468 sačinjena od 186 tkiva karcinoma kolona i 55 zdravih tkiva sluzokože kolona, kao i GSE62932 set sa 64 uzorka karcinoma i 4 uzorka zdravog tkiva. Setovi odabrani za analizu karcinoma pankreasa, sadržali su 139 uzoraka tumorskog tkiva i 102 kontrolna, zdrava tkiva (GSE 183795), 7 tumorskih i 9 kontrolnih (GSE22780), odnosno 4 tumorska i 4 kontrolna, zdrava tkiva pankreasa (GSE27890). Konačno, za analizu karcinoma prostate, odabrani su sledeći setovi: GSE6919 i GSE29079 koji su sadržali 131 uzorak tumorskog i 35 zdravih uzoraka tkiva, odnosno 47 tumorskih naspram 48 kontrolnih tkiva prostate, redom.

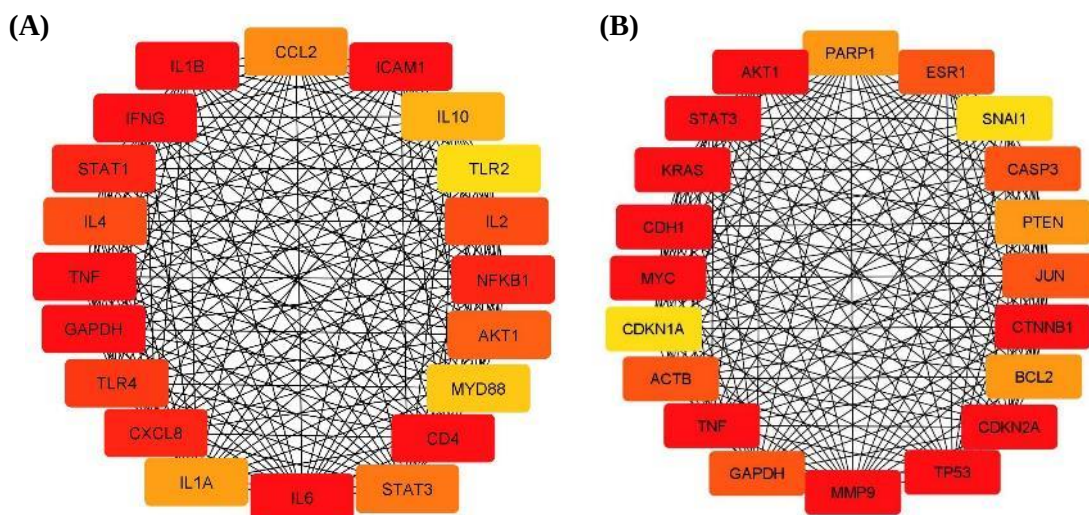
Prvo je svaki od navedenih setova unet u GEO2R program koji omogućava identifikaciju gena čija je ekspresija izmenjena u svakom od navedenog karcinoma u odnosu na

normalnu ćeliju, a potom je generisan Venov dijagram za DEG u cilju pronalaska povećano eksprimiranih, odnosno smanjeno eksprimiranih gena. Kod kolorektalnog karcinoma 277 gena izdvojilo se kao povećano eksprimirano, a 128 smanjeno eksprimirano, dok je za karcinom pankreasa pronađeno 20 povećano eksprimiranih i 14 smanjeno eksprimiranih gena u svim ispitivanim setovima. Konačno, u karcinomu prostate pronađeno je 37 povećano eksprimiranih i 13 smanjeno eksprimiranih gena zajedničkih za oba seta.

Potom su iz CTD baze podataka preuzeti geni koji interaguju sa SFN. Dobijeni geni ukršteni su sa izdvojenim setovima DEG u tkivima analiziranih karcinoma kako bi se utvrdilo na koje od njih SFN može da utiče. Identifikovano je 99 SFN-intereagujućih gena čija je ekspresija izmenjena u karcinomu kolona i to 66 povećano eksprimiranih i 33 smanjeno eksprimiranih. Pored toga, 12 DEG u karcinomu pankreasa (8 povećano eksprimirano i 4 smanjeno eksprimirana gena) i 21 gen u karcinomu prostate (10 povećano eksprimiranih i 11 smanjeno eksprimiranih) dovode se u vezu sa SFN. Lista svih izdvojenih gena, data je u Prilogu 1 (Tabela 1).

Analiza genske ontologije SFN-intereagujućih DEG izvedena je kako bi se identifikovala oboljenja povezana sa datim genima. Svaki set gena analiziran je posebno korišćenjem *Cytoscape* ClueGo+CluePedia alata, koja koristi podatke dostupne u KEGG, *WikiPathways*, i *Reactome* bazama podataka pri čemu je p vrednost $< 0,05$. Na slici 5 prikazani su putevi regulisani setom gena čija je ekspresija izmenjena u karcinomu kolona, a sa kojima intereaguje SFN. Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost SFN da utiče na puteve diferencijacije belih i braon adipocita, kao i na proces adipogeneze. Pored toga, dejstvom na *TIMP1*, *KLF4*, *COL1A1*, *MMP28*, *CXCL8*, *NOX4* i *CDK1* gene, SFN interferira sa procesom zarastanja rana i opekotina, pri čemu se može postaviti pitanje da li je njegov efekat pozitivan ili negativan.

gena čija je ekspresija izmenjena dejstvom PA-MSHA, među kojima je 48 gena povećano eksprimirano i 16 smanjeno eksprimirano nakon izlaganja pomenutoj bakteriji (Prilog 1, Tabela 2). Ovi geni su potom uneti u *Cytoscape* STRING alat koji formira mrežu interakcija između njih i predviđa 20 srodnih gena, sa nivoom pouzdanosti od $> 0,4$ po preporuci softvera. Posebno su formirane mreže za povećano i smanjeno eksprimirane gene, a potom je izvršena prioritizacija gena na isti način kao što je opisano za SFN, uz pomoć *CytoHubba* *Cytoscape* dodatka (Slika 6). Izdvojeni geni/proteini dalje su korišćeni za analizu genske onotologije.



Slika 6. Dvadeset najznačajnijih inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*-intereagujućih gena/proteina čija je ekspresija povećana (A) i smanjena (B) rangiranih pomoću *Cytoscape* *CytoHubba* alatke, MCC metodom (engl. Maximal Clique Centrality, MCC)

Intenzitet boje čvorova u mreži (gena/proteina) korelira sa njihovom značajnošću, pri čemu žuta predstavlja najnižu, a crvena najvišu značajnost gena/proteina

4.1.7. Genska ontologija inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*-intereagujućih gena

Analiza ontologije povećano i smanjeno eksprimiranih PA-MSHA-intereagujućih gena sprovedena je uz pomoć *Cytoscape* BINGO dodatka koji identifikuje biološke procese regulisane unetim setom gena. Za gene čija je ekspresija stimulisana dejstvom PA-MSHA identifikovan je 1131 proces, a najznačajnijih 10 je prikazano u Tabeli 6. Kao što je i očekivano, PA-MSHA indukuje ekspresiju gena uključenih u procese regulacije imunskog odgovora i produkcije citokina, dok je istom analizom utvrđeno da PA-MSHA suprimira gene značajne za proces apoptoze i regulaciju ćelijskog ciklusa (Tabela 7).

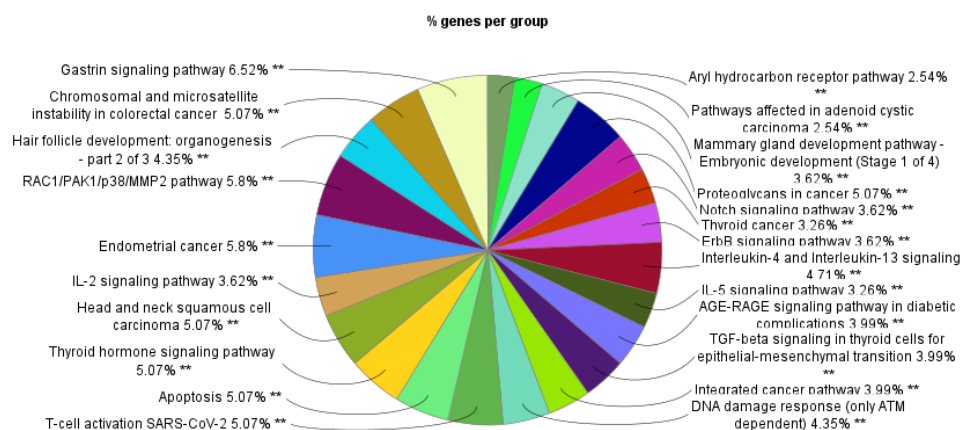
Tabela 6. Deset najznačajnijih bioloških procesa regulisanih povećano eksprimiranim inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*-intereagujućim genima dobijeni korišćenjem Cytoscape BINGO alatke (<https://apps.cytoscape.org/apps/bingo>)

ID biološkog procesa	Naziv	p vrednost	Geni
32675	Regulacija produkcije interleukina-6	1,43e ⁻¹⁵	<i>IL10, IL1A, IL6, IFNG, IL1B, TNF, TLR4, MYD88, TLR2</i>
48583	Odgovor na stimulse	2,08e ⁻¹⁵	<i>IL10, CXCL8, TNF, IL2, ICAM1, IL4, IL1A, IL6, IFNG, IL1B, AKT1, CCL2, TLR4, MYD88, TLR2</i>
45428	Regulacija procesa biosinteze azot-oksida	1,29e ⁻¹⁴	<i>IL10, IFNG, IL1B, AKT1, TNF, TLR4, ICAM1, TLR2</i>
6952	Imunski odgovor	1,30e ⁻¹⁴	<i>IL10, CXCL8, STAT3, TNF, NFKB1, IL4, IL1A, IL6, IFNG, IL1B, AKT1, CCL2, TLR4, MYD88, TLR2</i>
2697	Regulacija imunskih procesa	1,39e ⁻¹⁴	<i>IL10, IL4, IL6, IFNG, IL1B, TNF, TLR4, IL2, ICAM1, TLR2</i>
2700	Regulacija produkcije molekularnih medijatora imunskog odgovora	4,9e ⁻¹⁴	<i>IL10, IL4, IL6, IFNG, TNF, TLR4, IL2, TLR2</i>
31328	Pozitivna regulacija procesa ćelijske biosinteze	6,60e ⁻¹⁴	<i>IL10, STAT3, TNF, NFKB1, IL2, ICAM1, IL4, IL1A, IL6, CD4, IFNG, IL1B, AKT1, TLR4, TLR2</i>
9891	Pozitivna regulacija procesa biosinteze	6,60e ⁻¹⁴	<i>IL10, STAT3, TNF, NFKB1, IL2, ICAM1, IL4, IL1A, IL6, CD4, IFNG, IL1B, AKT1, TLR4, TLR2</i>
2376	Procesi imunskog sistema	6,60e ⁻¹⁴	<i>IL10, CXCL8, TNF, IL2, ICAM1, IL4, IL1A, IL6, CD4, IFNG, IL1B, AKT1, CCL2, TLR4, MYD88, TLR2</i>
1817	Regulacija produkcije citokina	6,60e ⁻¹⁴	<i>IL10, IL1A, IL6, CD4, IFNG, IL1B, CCL2, TNF, TLR4, MYD88, TLR2</i>

Tabela 7. Deset najznačajnijih bioloških procesa regulisanih smanjeno eksprimiranim inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*-intereagujućim genima dobijeni korišćenjem Cytoscape BINGO alata (<https://apps.cytoscape.org/apps/bingo>)

ID biološkog procesa	Naziv	p vrednost	Geni
42981	Regulacija apoptoze	3,57e ⁻¹¹	CDKN1A, JUN, CDKN2A, PTEN, ESR1, TNF, MMP9, CDH1, CASP3, BCL2, CTNNB1, AKT1, KRAS, TP53
43067	Regulacija programirane ćelijske smrti	3,57e ⁻¹¹	CDKN1A, JUN, CDKN2A, PTEN, ESR1, TNF, MMP9, CDH1, CASP3, BCL2, CTNNB1, AKT1, KRAS, TP53
10941	Regulacija ćelijske smrti	3,57e ⁻¹¹	CDKN1A, JUN, CDKN2A, PTEN, ESR1, TNF, MMP9, CDH1, CASP3, BCL2, CTNNB1, AKT1, KRAS, TP53
42493	Odgovor na lekove	8,5e ⁻¹¹	CDKN1A, JUN, CDH1, MYC, STAT3, PTEN, BCL2, CTNNB1, TNF, TP53
8637	Apoptotske promene mitohondrija	2,59e ⁻¹⁰	JUN, CDKN2A, CASP3, BCL2, AKT1, TP53
43065	Pozitivna regulacija apoptoze	2,59e ⁻¹⁰	CDKN1A, JUN, CDKN2A, CASP3, PTEN, BCL2, CTNNB1, AKT1, TNF, MMP9, TP53
43068	Pozitivna regulacija programirane ćelijske smrti	2,59e ⁻¹⁰	CDKN1A, JUN, CDKN2A, CASP3, PTEN, BCL2, CTNNB1, AKT1, TNF, MMP9, TP53
51726	Regulacija ćelijskog ciklusa	2,59e ⁻¹⁰	CDKN1A, JUN, CDKN2A, CDH1, CASP3, MYC, PTEN, BCL2, AKT1, TNF, TP53
10942	Pozitivna regulacija ćelijske smrti	2,59e ⁻¹⁰	CDKN1A, JUN, CDKN2A, CASP3, PTEN, BCL2, CTNNB1, AKT1, TNF, MMP9, TP53
42221	Odgovor na hemijske stimuluse	5,22e ⁻¹⁰	CDKN1A, JUN, STAT3, PTEN, ESR1, TNF, ACTB, CDH1, CASP3, MYC, BCL2, CTNNB1, AKT1, KRAS, TP53

Potom su molekularni procesi i putevi ispitani pomoću Cytoscape dodatka ClueGO + CluePedia kao što je prethodno objašnjeno. Povećano eksprimirani PA-MSHA geni grupisani su u 23 klastera među kojima su: Gastrin signalni put, Signalni put tiroidnih hormona, Apoptoza, kao i signalni putevi interleukina (IL-4 i IL-13, IL-2, IL-5) (Slika 7), dok su se smanjeno eksprimirani geni grupisali u 2 klastera i to: Malarija i PD-L1 ekspresija i PD-1 kontrolni put u tumorima.



Slika 7. Klasteri molekularnih procesa i puteva regulisanih genima čija je ekspresija indukovana dejstvom inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

Procenat označava broj gena iz seta uključenih u regulaciju svake od navedenih molekularnih grupa (Cytoscape ClueGo + CluePedia; baze podataka KEGG, Reactome i WikiPathways su odabrane za analizu puteva kao i dvofazni hipergeometrijski statistički test sa Bonferroni step-down korekcijom i κ vrednošću 0,3)

SFN i PA-MSHA intereaguju sa 13 zajedničkih gena i to *AKT1*, *BAD*, *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CCL2*, *CD14*, *CDH1*, *CDKN1A*, *IFNG*, *TLR4*, *TLR6* i *TNF*, koji su uključeni u proces apoptoze i regulacije imunskog odgovora. Dok PA-MSHA stimuliše ekspresiju svih identifikovanih zajedničkih gena, SFN deluje inhibitorno na *BAD* i *IFNG*. Pored toga, zabeležene su dvojne interakcije između SFN i *TNF*, *CCL2*, *CDH1* i *AKT1* gena (CTD, *Chemical-gene interaction Query*), odnosno SFN može dovesti do njihove pojačane ili smanjene ekspresije. Na preostale gene (*BAX*, *CASP8*, *CASP3*, *CD14*, *CDKN1A*, *TLR4* i *TLR6*) SFN deluje u istom smeru kao i PA-MSHA, odnosno dalje pojačava njihovu ekspresiju što može dovesti do pojačanog odgovora imunskog sistema i/ili apoptoze (Prilog 1, Tabela 3).

4.2. Ispitivanje citotoksičnog potencijala u *in vitro* uslovima

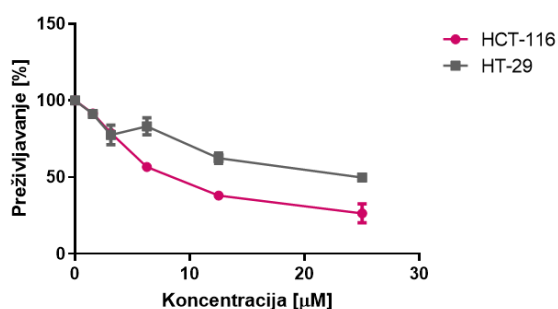
4.2.1. Citotoksičnost

Citotoksičnost SFN, odnosno njegov potencijal da zaustavi rast i razvoj ćelija ispitan je na 2 ćelijske kulture humanog karcinoma kolona, HCT-116 i HT-29, kao i na ćelijama fibroblasta pluća, MRC-5. U HT-29 ćelijskoj liniji mutiran je *p53*, tumor supresorni gen uključen u proces apoptoze. Ćelijske linije tretirane su rastućim koncentracijama SFN (1,156, 3,125, 6,25, 12,5 i 25 μ M) tokom 72 h, nakon čega je određena vijabilnost ćelija MTT testom i izračunata vrednost inhibitorne koncentracije (IC₅₀). Tretman HCT-116 i HT-29 ćelija SFN je pokazao dozno zavisnu citotoksičnost. HCT-116 ćelije pokazale su veću osetljivost na SFN (IC₅₀ = 8,41 μ M), dok je IC₅₀ za HT-29 iznosila 24,83 μ M (Tabela 8). U daljim eksperimentima korišćene su IC₅₀ vrednosti SFN i to: za HCT-116 10 μ M, a za HT-29, 25 μ M.

Tabela 8. Izračunata IC50 koncentracija sulforafana nakon 72 h kontinuiranog tretmana HCT-116 i HT-29 ćelija

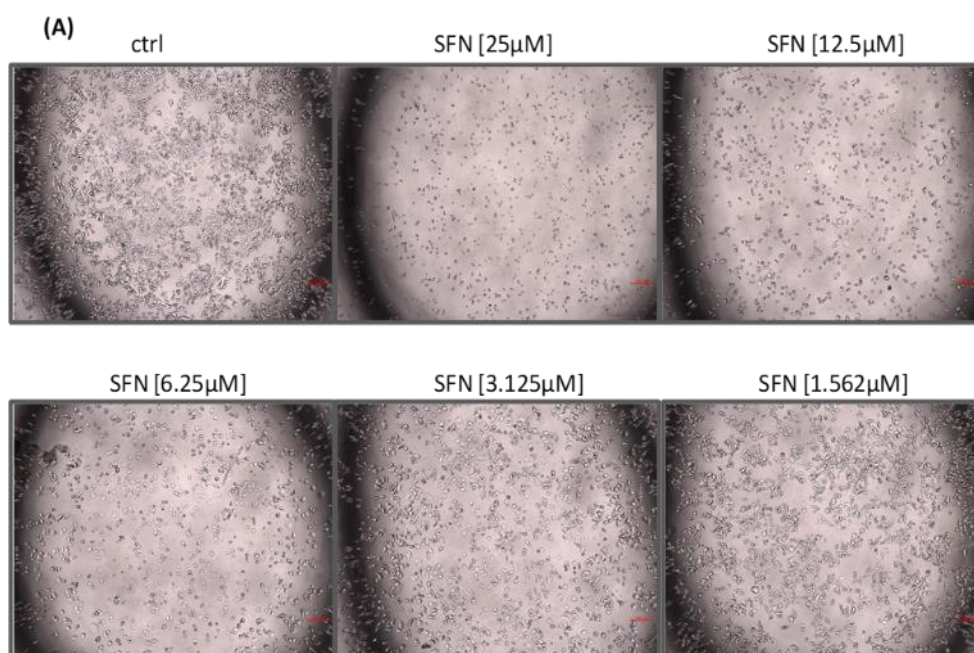
SFN	IC50 (μM)	
	HCT-116	HT-29
	$8,41 \pm 0,88$	$24,83 \pm 0,10$

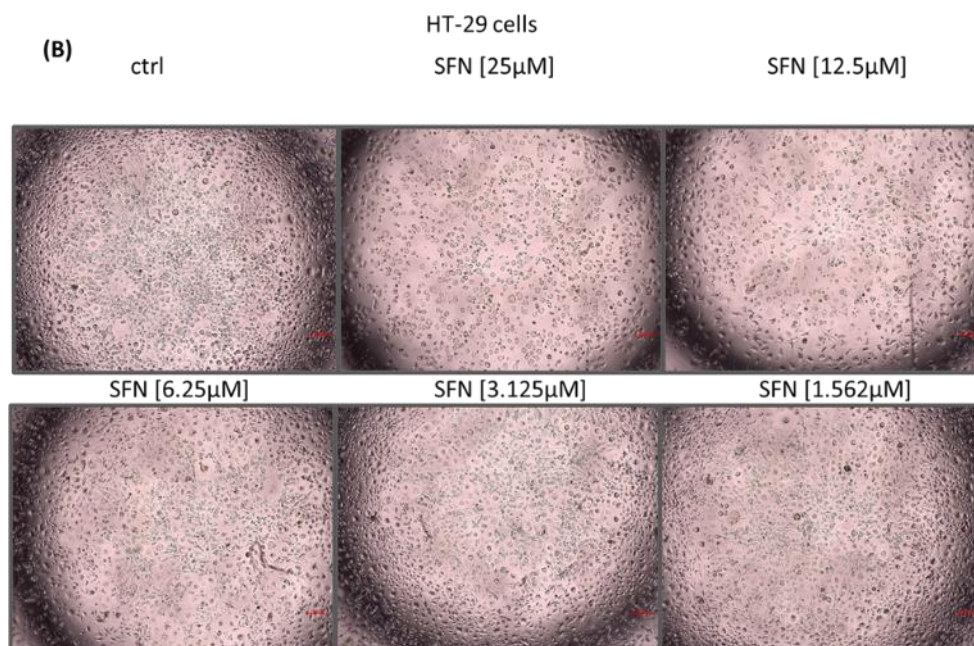
Na slici 8 prikazano je preživljavanje ćelija karcinoma kolona tretiranih rastućim koncentracijama SFN, dok je preživljavanje MRC-5 ćelija prikazano na Slici 2, Prilog 1 ($\text{IC}_{50} = 23,93 \mu\text{M}$).



Slika 8. Krive preživljavanja HCT-116 i HT-29 ćelija nakon tretmana rastućim koncentracijama sulforafana tokom 72 sata

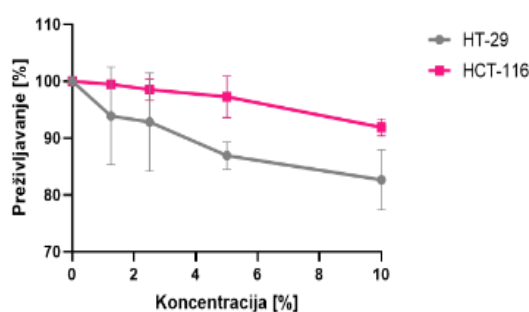
Mikroskopska analiza HT-29 i HCT-116 ćelija je pokazala da nakon tretmana SFN u trajanju od 72 h, pri koncentracijama koje odgovaraju IC_{50} vrednosti, dolazi do morfoloških promena ćelija i uočljivog smanjenja gustine ćelija u poređenju sa kontrolnim, netretiranim ćelijama, što je prikazano na Slici 9. Uočene promene zavisile su od primenjene koncentracije.





Slika 9. Mikrografije HTC-116 i HT-29 kontrolnih ćelija i ćelija tretiranih rastućim koncentracijama sulforafana tokom 72 h. Uveličanje: 20x, skala: 100 μ m A) Morfološke promene HCT-116 ćelija nakon tretmana rastućim koncentracijama sulforafana (SFN); B) Morfološke promene HT-29 ćelija nakon tretmana rastućim koncentracijama sulforafana (SFN)

Citotoksični, odnosno antiproliferativni efekat PA-MSHA ispitan je MTT testom pri rastućim koncentracijama inaktivisane bakterije (1,25%, 2,5%, 5% i 10%, odnosno $0,225 \times 10^8$ ćelije, $0,45 \times 10^8$ ćelije, $0,9 \times 10^8$ ćelije i $1,8 \times 10^8$ ćelije, redom) tokom 72 h. Isti efekat uočen je i pri primeni najniže i najviše koncentracije PA-MSHA na odabranim ćelijskim linijama zbog čega se ne može izvesti zaključak da u *in vitro* uslovima pokazuje citotoksičnost (Slika 10). Budući da PA-MSHA spada u grupu imunomodulatora, za ispoljavanje citotoksičnog efekta potreban je drugačiji eksperimentalni sistem koji uključuje i ćelije imunskog sistema.



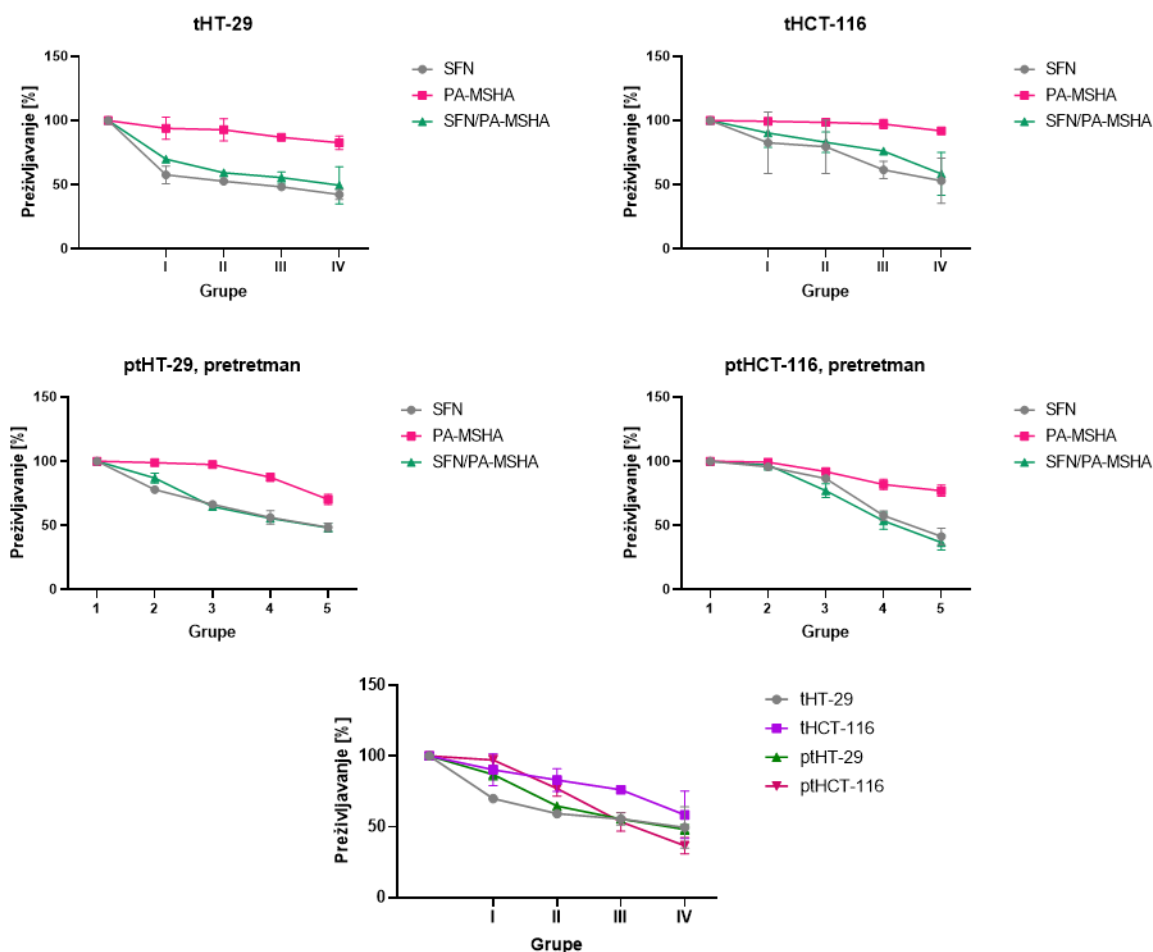
Slika 10. Krive preživljavanja HCT-116 i HT-29 ćelija nakon tretmana rastućim koncentracijama inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* tokom 72 sata

Citotoksični efekat kombinacije SFN i PA-MSHA ispitan je, takođe, na dve ćelijske linije humanog karcinoma kolona, HCT-116 i HT-29. Ćelije su tretirane sa 4 različite kombinacije SFN i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* pri konstantnom odnosu prikazanom u Tabeli 9 i to: a) istovremeno tokom 72 h i b) SFN tokom 24 h, a potom PA-MSHA još 72 h, nakon čega je određena vijabilnost ćelija.

Tabela 9. Kombinacije koncentracija sulforafana i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* korišćene za ispitivanje citotoksičnog efekta MTT testom

Grupa	HCT-116	HT-29
	SFN (μ M) + PA-MSHA (%)	SFN (μ M) + PA-MSHA (%)
I	2,5 + 1,25	6,25 + 1,25
II	5 + 2,5	12,5 + 2,5
III	10 + 5	25 + 5
IV	20 + 10	50 + 10

U oba slučaja, uočeno je da SFN diktira citotoksičnost, kao i da su HCT-116 ćelije osetljivije na primenjenu kombinaciju imunomodulatora. Takođe, pretretman SFN doveo je do smrti većeg broja ćelija u odnosu na istovremenu primenu SFN i PA-MSHA, pri čemu je efekat citotoksičnosti SFN zavisao od primenjene koncentracije (Slika 11). Kako kombinovani tretman nije pokazao sinergističko citotoksično dejstvo na ispitivanim ćelijskim linijama, u narednim eksperimentima ispitivan je mehanizam koji leži u osnovi antitumorskog efekta SFN *in vitro*.

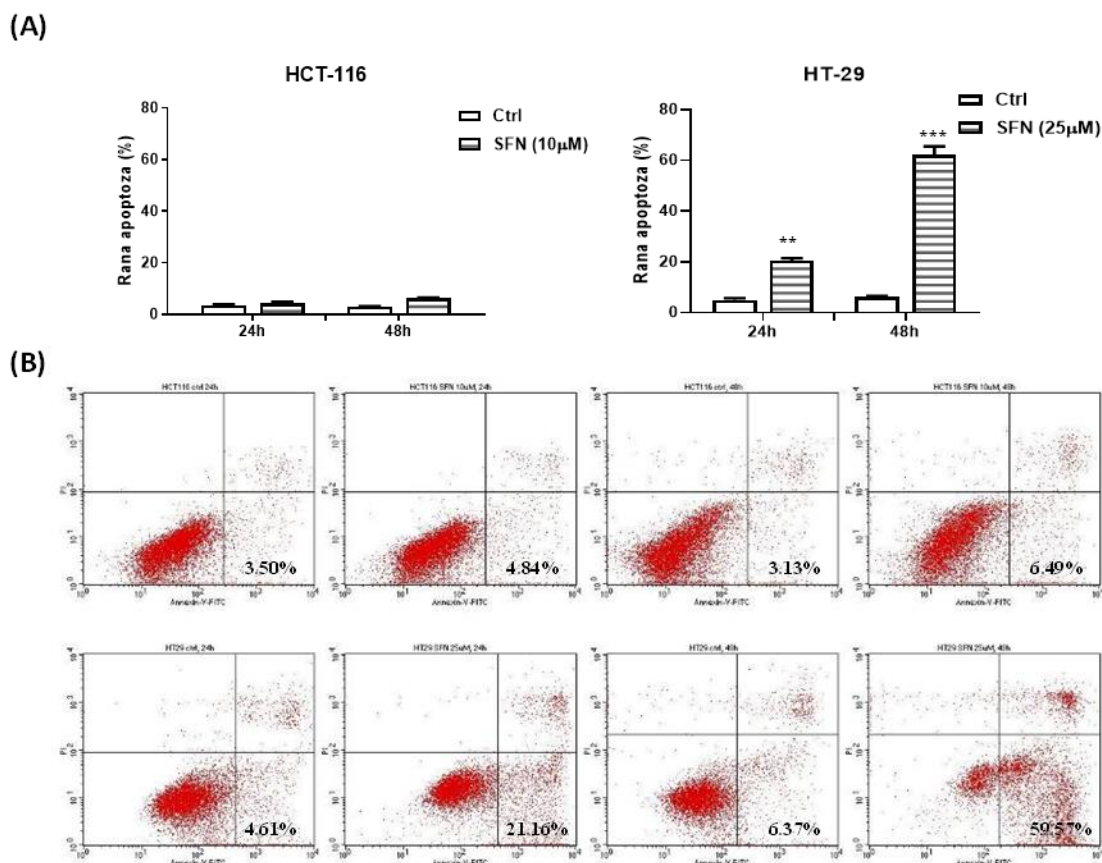


Slika 11. Krive preživljavanja HCT-116 i HT-29 ćelija nakon tretmana rastućim koncentracijama sulforafana (SFN) i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* (PA-MSHA) pojedinačno i u kombinaciji, pri konstantnom odnosu

ptHT-29 - ćelije tretirane SFN tokom 24 h + 72 h PA-MSHA; ptHCT-116 - ćelije tretirane SFN tokom 24 h + 72 h PA-MSHA; tHT-29 - ćelije tretirane kombinacijom SFN i PA-MSHA tokom 72 h; tHCT-116 - ćelije tretirane kombinacijom SFN i PA-MSHA tokom 72 h

4.2.2. Proapoptotski potencijal

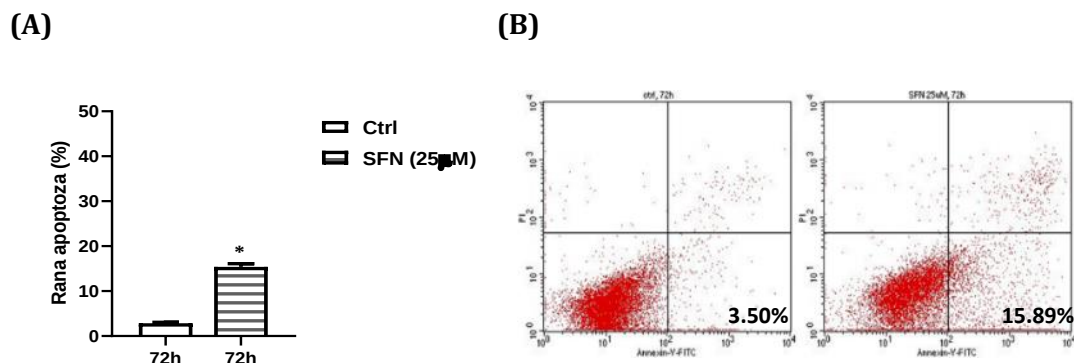
U cilju daljeg ispitivanja mehanizma antitumorskog efekta SFN, ispitivana je sposobnost SFN da uvode ćelije adenokarcinoma kolona u apoptotsku ćelijsku smrt, kao jedan vid programirane ćelijske smrti. Rana apoptoza ćelija karcinoma kolona tretiranih IC50 vrednostima SFN, detektovana je protočnom citometrijom korišćenjem dvokolornog bojenja Annexin V/PI, nakon 24 i 48 h kontinuiranog tretmana. Ranu apoptozu karakteriše gubitak simetrije ćelijske membrane i promena fosfolipidnog sastava što je detektovano samo u HT-29 ćelijama u obe vremenske tačke. Posle 24 h tretmana HT-29 ćelija SFN indukuje apoptozu kod 21% ukupnog broja tretiranih ćelija. Nakon 48 h tretmana 60% ćelija nalazi se u ranoj fazi apoptoze (Slika 12). Važno je istaći da se u kasnoj apoptozu/nekrozi nalazi tek 10% ćelija. Za razliku od HT-29 ćelija, indukcija apoptoze SFN kod HCT-116 ćelija nije primećena ni nakon 48 h tretmana (Slika 12). Dobijeni rezultati pokazuju da SFN indukuju ranu apoptozu samo u HT-29 ćelijama i da je taj efekat vremenski zavisian.



Slika 12. Uticaj sulforafana na indukciju apoptoze HCT-116 i HT-29 ćelija nakon 24 i 48 h tretmana

Udeo rano-apoptotskih ćelija u ćelijskim populacijama, meren je dvokolornim bojenjem Annexin V/propidijum-jodidom na protočnom citometru. Ćelije su tretirane sulforafanom tokom 24 i 48 h, pri koncentraciji koja odgovara IC50 vrednosti (10 μM za HCT-116 i 25 μM za HT-29). (A) Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta. (B) Reprezentativni tačkasti dijagrami distribucije HCT-116 i HT-29 SFN tretiranih ćelija nakon dvokolornog bojenja aneksin V-FITC/PI, i određivanja protočnom citometrijom

Za razliku od HT-29 ćelija, čak i nakon 72 h tretmana HCT-116 ćelija pri koncentraciji od 25 μ M (koja je 2,5 puta veća od IC50 koncentracije dobijene MTT testom na 72 h), SFN nije izazvao značajno povećanje procenta apoptotičnih ćelija što je potvrđeno dvokolornim bojenjem na protočnom citometru (Slika 13). Dobijeni rezultati ukazuju da apoptoza nije dominantni tip ćelijske smrti SFN tretiranih HCT-116 ćelija.

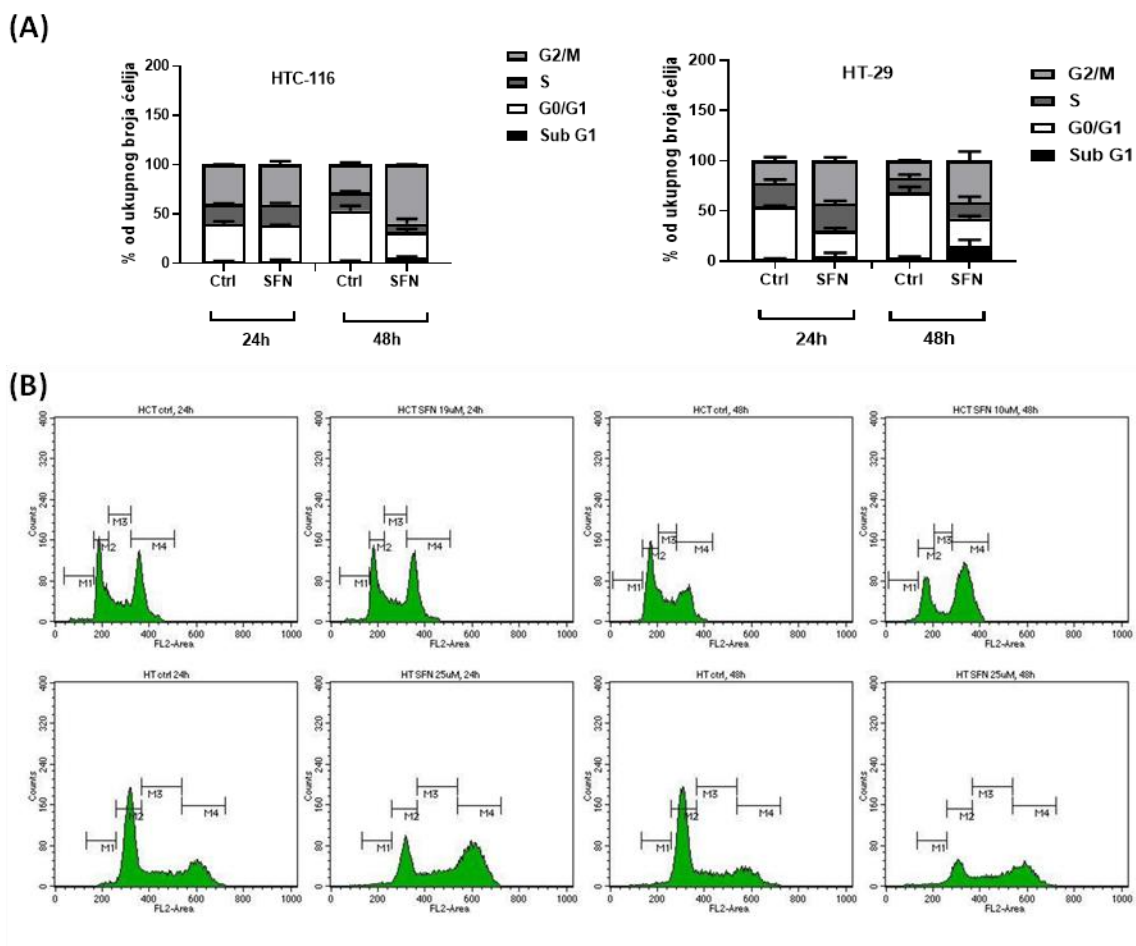


Slika 13. Uticaj 25 μ M sulforafana na indukciju apoptoze HCT-116 ćelija nakon tretmana tokom 72 h

(A) Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta; (B) Reprezentativni tačkasti dijagrami distribucije HCT-116 SFN tretiranih ćelija nakon dvokolornog bojenja aneksin V-FITC/PI, i određivanja protočnom citofluorimetrijom

4.2.3. Uticaj na na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

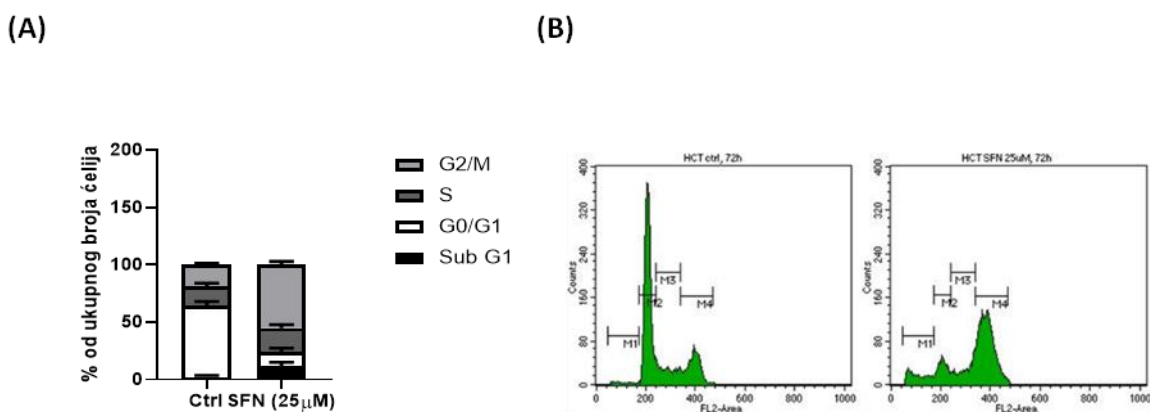
Nakon tretmana HCT-116 i HT-29 ćelija SFN pri koncentracijama koje odgovaraju IC50 vrednosti tokom 24 h i 48 h, uočeno je da SFN utiče na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. U slučaju HCT-116 ćelija, pokazano je da SFN sprečava njihovu proliferaciju nakon 48 h i to akumulirajući ćelije u G2/M fazi ćelijske deobe (60% u odnosu na kontrolne ćelije gde je 30% ćelija u G2/M fazi), što znači da se zastoje u ćelijskom ciklusu javlja neposredno pre ili tokom mitoze. Kod HT-29 ćelija efekat je uočen i nakon 24 h kada dolazi do zastoja u G2/M fazi (45% u odnosu na kontrolne ćelije gde je 20% ćelija u G2/M fazi). Nakon 48 h, najveći broj HT-29 ćelija tretiranih SFN se i dalje akumulira u G2/M fazi, ali je primećen i porast broja ćelija u sub G1 populaciji koja je karakteristična za ćelije sa fragmentisanim sadržajem DNK, i njihovo prisustvo ukazuje na apoptozu (Slika 14).



Slika 14. Uticaj sulforafana na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa HCT-116 i HT-29 ćelija nakon 24 i 48 h kontinuiranog tretmana

(A) Reprezentativni histogrami netretiranih i SFN tretiranih ćelija, koje su nakon tretmana bojene propidijum-jodidom i analizirane na protočnom citometru. (B) Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta

Nakon 72 h tretmana HCT-116 ćelija SFN pri koncentraciji od 25 μ M (koja je 2,5 puta veća od IC50 koncentracije dobijene MTT testom na 72 h), dolazi do zastoja ćelija u G2/M, kao i malog povećanja ćelija u sub G1 fazi što je prikazano na Slici 15.

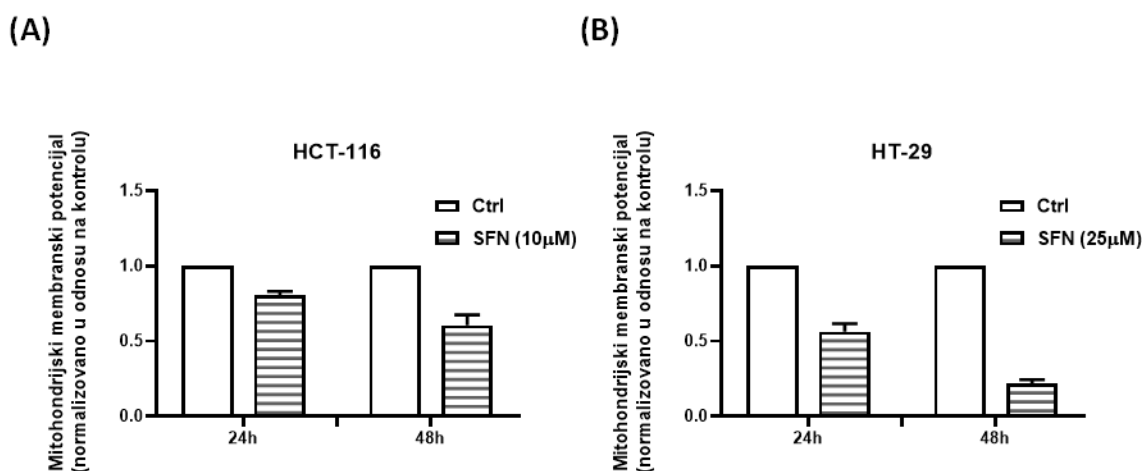


Slika 15. Uticaj sulforafana na HCT-116 ćelije nakon tretmana 25 μ M SFN tokom 72 sata

(A) Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta. (B) Reprezentativni histogrami netretiranih i SFN tretiranih ćelija, koje su nakon tretmana bojene propidijum-jodidom i analizirane na protočnom citometru

4.2.4. Uticaj na promenu mitohondrijskog membranskog potencijala

Ispitan je uticaj SFN na mitohondrijski membranski potencijal ($\Delta\Psi_m$) tretiranih ćelija u različitim vremenskim intervalima. HTC-116 i HT-29 ćelije su tretirane sa SFN pri koncentraciji koja odgovara IC50 vrednosti 24 h i 48 h, nakon čega su ćelije bojene JC-1 bojom i analizirane na protočnom citometru. Značajan pad membranskog potencijala ($\Delta\Psi_m$) pokazan je u HCT-116 ćelijama nakon 48 h tretmana (Slika 16, levo), dok je kod HT-29 već nakon 24 h tretmana SFN primećen značajan pad potencijala (Slika 16, desno), što može da ukazuje na aktivaciju unutrašnjeg puta apoptoze.

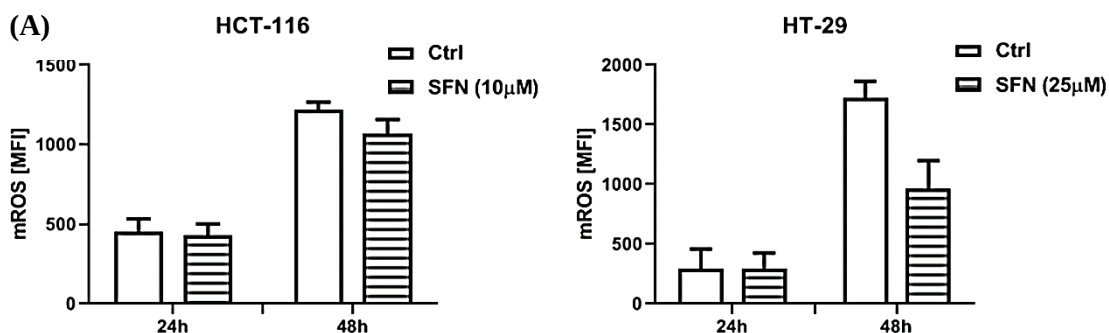


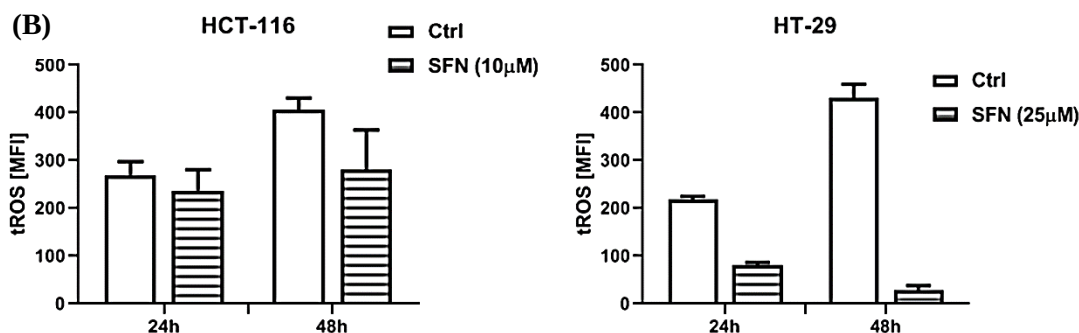
Slika 16. Uticaj sulforafana na promenu mitohondrijskog membranskog potencijala nakon 24 i 48 h u HCT-116 ćelijama (A) i HT-29 ćelijama (B)

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta

4.2.5. Uticaj na produkciju slobodnih radikala

Nivo ukupnih ROS i mitohondrijskog superoksida određen je u ćelijskim kulturama HCT-116 i HT-29 tretiranim SFN tokom 24 i 48 h korišćenjem protočnog citometra i fluorescentne boje DCFH-DA i MitoSox Red, redom. Dobijeni rezultati pokazuju da SFN ne utiče značajno na nivo mitohondrijskog superoksida (mROS), ali smanjuje nivo ukupnih ROS u HT-29 ćelijama nakon 24 h tretmana. Smanjenje ROS perzistiralo je i nakon 48 h tretmana (Slika 17).



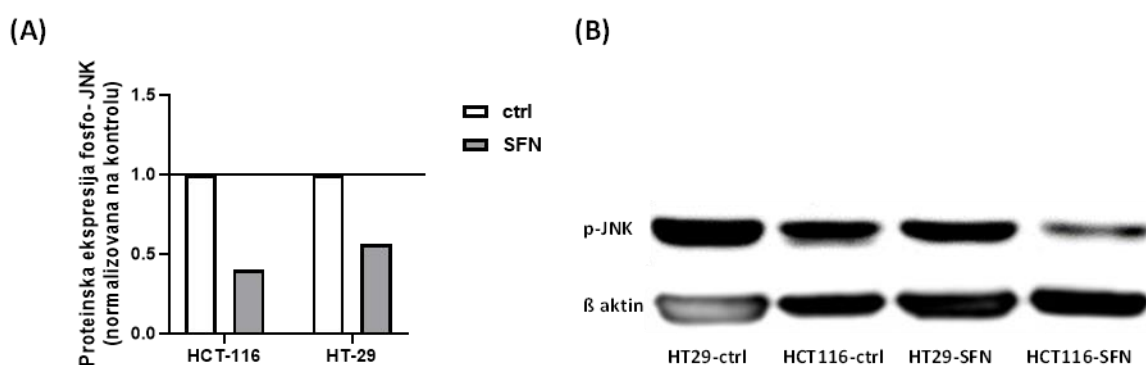


Slika 17. Uticaj sulforafana na nivo mitohondrijskog superoksida (A) i reaktivnih kiseoničnih vrsta (B) nakon 24 i 48 h tretmana u HCT-116 i HT-29 ćelijama

mROS: ukupni mitohondrijski superoskid; tROS: ukupni reaktivni kiseonični radikali; MFI: intenzitet fluorescencije (engl. *Mean Fluorescence Intensity*)

4.2.6. Uticaj na proteinsku ekspresiju

C-Jun N-terminalna kinaza (JNK) je proteinska kinaza uključena u različite ćelijske procese, uključujući ćelijski rast, apoptozu i inflamaciju. Kako je predhodno pokazano da SFN ispoljava antitumorski efekat kroz narušavanje ćelijskog ciklusa, zaustavljajući HCT-116 i HT-29 ćelije u G2/M fazi ćelijskog ciklusa, kao i indukciju apoptotske ćelijske smrti, bar kod HT-29 ćelija, sledeći korak je bio ispitivanje efekta SFN na proteinsku ekspresiju fosforilisane forme JNK i isečene forme PARP (engl. *cleaved PARP*) koju seče kaspaza 3, primenom *Western blot* tehnike. Ćelije su tretirane SFN 24 h pri koncentraciji koja odgovara IC₅₀ vrednosti. SFN značajno smanjuje proteinsku ekspresiju fosfo-JNK u obe ćelijske linije (Slika 18), dok traka za PARP nije dobijena (rezultati nisu prikazani).



Slika 18. Uticaj sulforafana na proteinsku ekspresiju C-Jun N-terminalne kinase

Nakon 24 h tretmana HCT-116 i HT-29 ćelija SFN pri koncentraciji 10 μM i 25 μM redom, ćelijski lizati su podvrgnuti imunoblotu. Membrane su inkubirane sa zečijim fosfo-c-Jun (Ser73) antitelom, koje prepoznaje aktivnu, fosforilisanu formu JNK na Ser73. Membrana je inkubirane i sa mišjim β-aktin antitelom, čiji bazalni nivo potvrđuje uspešnost metode i koje se koristi za normalizaciju ekspresije p-JNK. (A) Rezultat kvantifikacije traka dobijenih *Western blot* metodom, koje odgovaraju fosforilisanom formi JNK proteina. (B) Reprezentativna membrana: Kvantifikacija traka dobijenih u *Western blot* metodi je odrađena densitometrijskom analizom, koristeći GS-710 *Calibrated Imaging Densitometer*- Bio-Rad i *ImageJ* softver. Relativna količina p-JNK proteina u lizatima tretiranih ćelija normalizovana je na odgovarajuću kontrolu

4.3. In vivo analiza

4.3.1. Rezultati na modelu zeblice

4.3.1.1. Sulforafan

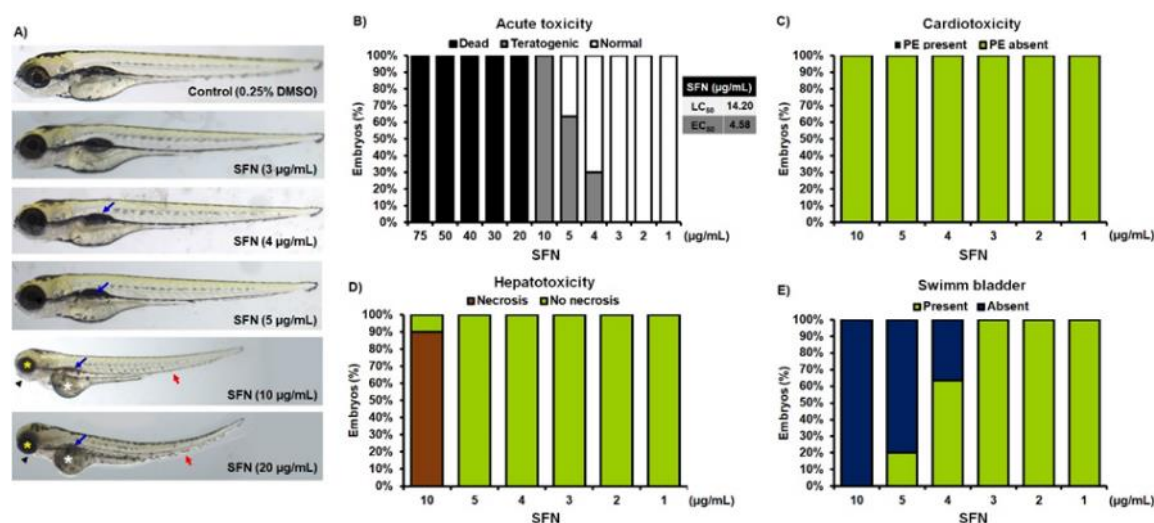
Rezultati ispitivanja akutne toksičnosti SFN pokazali su koncentraciono-zavisan efekat testirane supstance na preživljavanje, rast i razvoj embriona zebrice tokom petodnevnog tretmana. Na osnovu morfologije tretiranih embriona ustanovljene su minimalne koncentracije SFN koje mogu dovesti do pojave štetnih efekata, kao i letalna LC50 vrednost koje su prikazane u Tabeli 10.

Tabela 10. Srednja letalna koncentracija i najniže koncentracije sulforafana koje dovode do pojave toksičnih efekata na eksperimentalnom modelu embriona zebrica

	LC50	Teratogenost	Hepatotoksičnost	Toksičnost za mehur
SFN (µg/ml)	14,2	4	10	4

SFN: sulforafan; LC50: letalna koncentracija

Pri koncentracijama SFN ≥ 4 µg/ml (22,56 µM) primećen je uticaj na razvoj mehura kod oko 30% embriona, dok je pri koncentraciji od 10 µg/ml ovaj efekat uočen kod svih embriona zebrica. Takođe, samo pri koncentraciji od 56,4 µM (10 µg/ml) uočena je nekroza jetre kod 90% tretiranih embriona zebrica, dok kardiotoksičnost nije uočena ni pri primeni najviše ispitivane koncentracije SFN (10 µg/ml) (Slika 19).

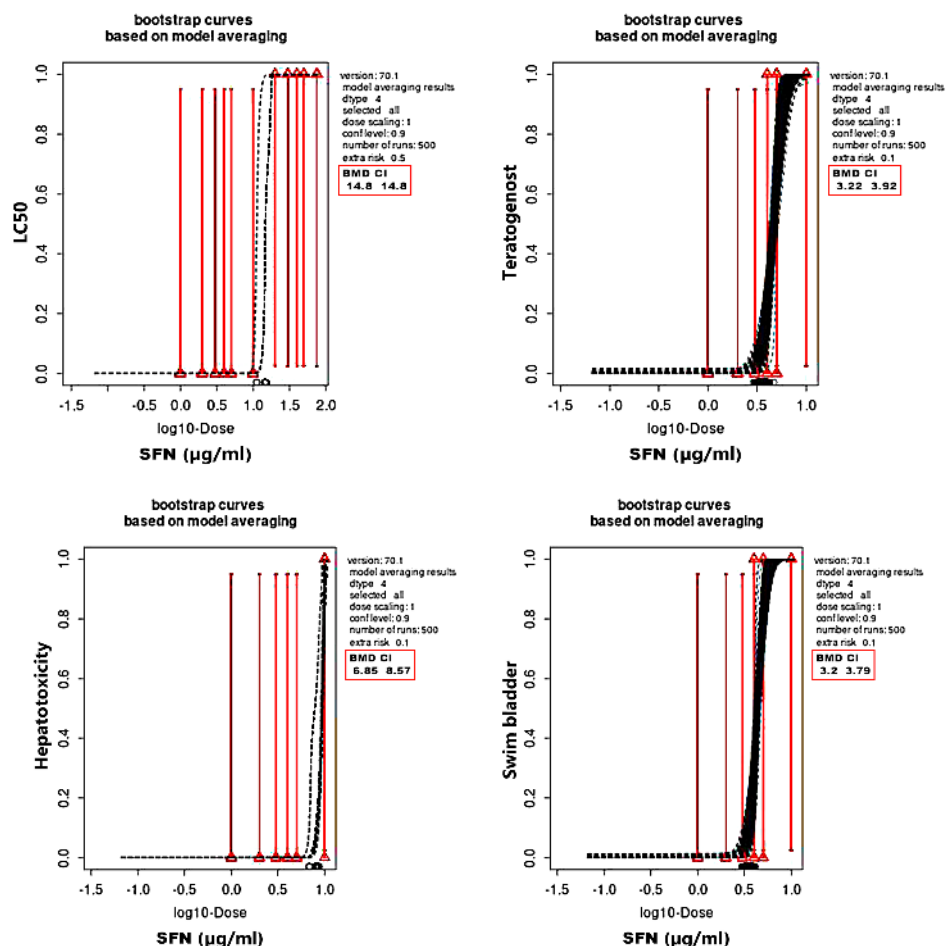


Slika 19. Akutna toksičnost rastućih koncentracija sulforafana na embrionima zebrica nakon petodnevnog tretmana; (A) prikaz embriona zebrice sa efektima; (B) efekti na preživljavanje i rast i razvoj embriona; (C) efekti pojave perikardijalnog edema; (D) efekti nekroze žumanceta i jetre; (E) efekti na razvoj mehura

4.3.1.1.1 Modelovanje odnosa koncentracija-odgovor

Da bi se dalje ispitao toksični uticaj SFN na embrionima zebrica u smislu odnosa primenjene koncentracije i uočenog odgovora, sprovedena je BMC analiza. U ovom koraku, ispitana je zavisnost kardiotoksičnosti (procenjena na osnovu prisustva, odnosno odsustva perikardijalnog edema), hepatotoksičnosti (procenjena na osnovu pojave

nekroze), uticaja na razvoj mehura (procenjen na osnovu prisustva, odnosno odsustva mehura) i teratogenosti od primenjene koncentracije SFN. Prikazani grafici (broj iteracija: 500) zasnovani na fitovanju najboljeg modela (Slika 20), pri čemu su rezultati izraženi kao BMCL i BMCU, odnosno predstavljaju donju i gornju granicu intervala pouzdanosti od 95%, redom. Efekat SFN pri svakoj primenjenoj koncentraciji predstavljen je kvantalno, odnosno jedinicom i nulom u zavisnosti od toga da li je ispitivan štetni efekat uočen ili je izostao. Trend krivih prikazanih na Slici 20 pokazuje da sa porastom koncentracije SFN raste i verovatnoća pojave štetnih efekata. Dobijene vrednosti BMCL ukazuju na to da SFN može izazvati malformacije embriona (teratogenost) i uticati na razvoj mehura pri koncentraciji većoj od 3,32 $\mu\text{g/ml}$ odnosno 3,2 $\mu\text{g/ml}$, redom. Do pojave nekroze jetre dovodi dvostruko viša koncentracija SFN (6,85 $\mu\text{g/ml}$ i više). Konačno, LC50 vrednost, odnosno koncentracija SFN koja dovodi do letalnog ishoda 50% tretiranih embriona zebrica iznosila je 14,8 $\mu\text{g/ml}$, što je u saglasnosti sa prethodno izračunatom vrednošću LC50 od 14,2 $\mu\text{g/ml}$. Važno je napomenuti da su svi intervali pouzdanosti bili uski, sugerišući dozno-zavisnu vezu između primenjene koncentracije SFN i ispitivanih štetnih efekata.



Slika 20. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih koncentracija sulforafana i letalnog ishoda, teratogenosti, hepatotoksičnosti i uticaja na razvoj mehura na embrionima zebrica

4.3.1.2. Inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Rezultati ispitivanja akutne toksičnosti PA-MSHA pokazali su da ispitivani imunomodulator nije pokazao štetne efekte u koncentraciji do 0,3% odnosno $5,4 \times 10^{12}$ ćelija/ml, dok u većim koncentracijama indukuje pojavu kardiotoksičnosti (perikardijalni

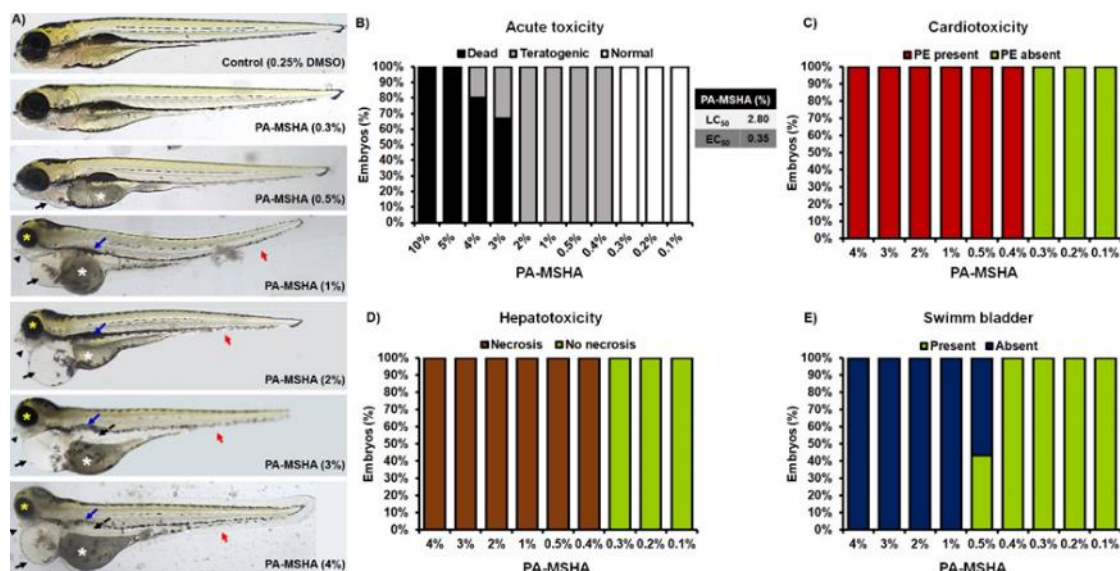
edem i usporavanje rada srca) i hepatotoksičnosti (nekroza jetre, žumanceta i odsustvo respiracije žumanceta) kod svih tretiranih embriona. Izračunate minimalne koncentracije koje dovode do pojave štetnih efekata date su u Tabeli 11.

Tabela 11. Letalna koncentracija (LC50) i najniže koncentracije PA-MSHA koje dovode do pojave toksičnih efekata na eksperimentalnom modelu embriona zebrica

	LC50	Teratogenost	Hepatotoksičnost	Kardiotoksičnost	Toksičnost za mehur
PA-MSHA (%)	2,8	0,4	0,4	0,4	0,5

PA-MSHA: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*; LC50: letalna koncentracija

Uticaj na razvoj mehura, primećen je kod 60% tretiranih embriona zebrica pri koncentraciji od 0,5%, odnosno kod svih embriona kada je koncentracija PA-MSHA bila veća ili jednaka 1% ($\geq 1,8 \times 10^7$ ćelija/ml). Teratogeni efekat kod tretiranih embriona primećen je, pri koncentracijama većim od 0,3% ($5,4 \times 10^6$ ćelija/ml). Letalni ishod je zabeležen kod skoro 70% ispitivanih embriona pri koncentraciji od 3% ($5,4 \times 10^7$ ćelija/ml), dok je tretman sa 5% PA-MSHA doveo do smrti svih ispitivanih embriona. Izračunata LC50 vrednost iznosila je 2,8% što odgovara $5,04 \times 10^7$ ćelija/ml (Slika 21).

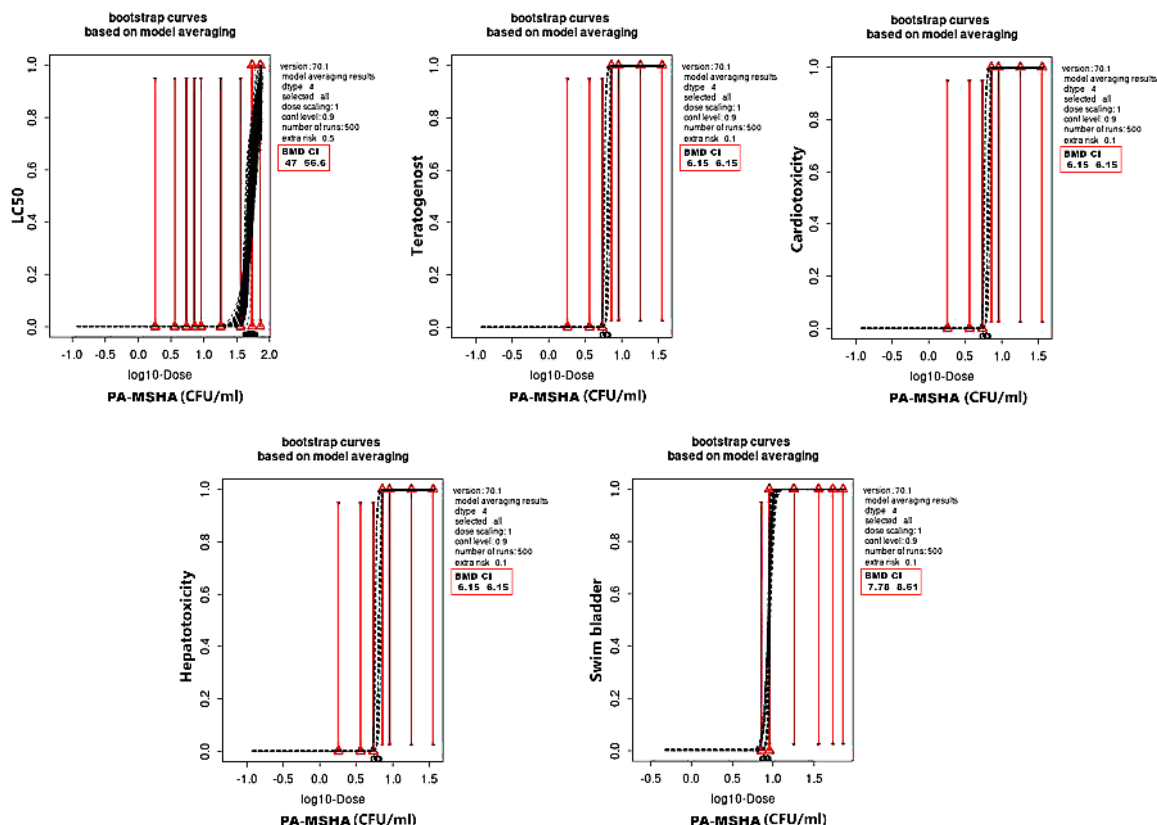


Slika 21. Akutna toksičnost rastućih koncentracija inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na embrionima zebrica nakon petodnevnog tretmana; (A) prikaz embriona zebrice sa efektima; (B) efekti na preživljavanje, rast i razvoj embriona; (C) efekti pojave perikardijalnog edema; (D) efekti nekroze žumanceta i jetre; (E) efekti na razvoj mehura

4.3.1.2.1. Modelovanje odnosa koncentracija-odgovor

Da bi se dalje ispitao uticaj PA-MSHA na embrionima zebrica u smislu odnosa koncentracija-odgovor, sprovedena je BMC analiza, a u cilju izračunavanja donje i gornje granice intervala pouzdanosti, BMCL i BMCU. Efekat PA-MSHA pri svakoj primenjenoj koncentraciji predstavljen je kvantitativno, odnosno jedinicom i nulom u zavisnosti od toga da li je došlo do ispoljavanja ispitivanog štetnog efekta ili je on izostao. Trend dobijenih krivih pokazuje da sa porastom koncentracije PA-MSHA raste i verovatnoća pojave štetnih efekata. Rezultati ukazuju na sposobnost PA-MSHA da pri koncentraciji od 0,342%, odnosno $6,15 \times 10^6$ ćelija/ml izazove pojavu štetnih efekata na nivou kardiovaskularnog sistema, odnosno pojavu edema, kao i nekrozu jetre i malformacije embriona zebrica

(teratogenost) (Slika 22). Takođe, utvrđeno je da PA-MSHA utiče na razvoj mehura pri koncentraciji od 0,432% ($7,78 \times 10^6$ ćelija/ml). Konačno, korišćenjem BMC analize izračunat je i interval LC50 vrednosti, i to $4,7 \times 10^7$ ćelija/ml do $5,66 \times 10^7$ ćelija/ml, što je u saglasnosti sa eksperimentalno dobijenom vrednošću od 2,8% odnosno $5,04 \times 10^7$ ćelija/ml (Slika 22). Kao i u slučaju SFN, svi intervali pouzdanosti bili su uski, sugerišući visok nivo pouzdanosti rezultata.



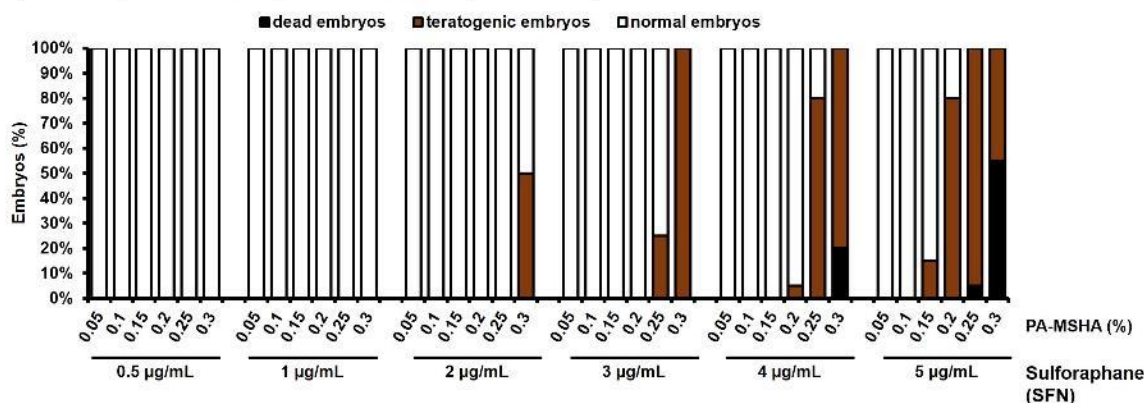
Slika 22. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih koncentracija inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i letalnog ishoda, kardiotsičnosti, teratogenosti, hepatotoksičnosti i uticaja na razvoj mehura na embrionima zebrića

4.3.1.3. Kombinovana primena imunomodulatora

Toksičnost kombinacije SFN i PA-MSHA je ispitana u koncentracijama pojedinačnih imunomodulatora koje nisu ispoljile bilo kakav štetan uticaj na preživljavanje embriona, niti su dovele do pojave štetnih efekata, odnosno testirane koncentracije za SFN su 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml i 5 µg/ml, a za PA-MSHA: 0,05%, 0,1%, 0,15%, 0,2%, 0,25% i 0,3% ($0,9 \times 10^6$ ćelija/ml, $1,8 \times 10^6$ ćelija/ml, $2,7 \times 10^6$ ćelija/ml, $3,6 \times 10^6$ ćelija/ml, $4,2 \times 10^6$ ćelija/ml i $5,4 \times 10^6$ ćelija/ml). Rezultati ispitivanja toksičnosti kombinacije SFN i PA-MSHA su prikazani na Slici 23. Uočeno je da kombinacija SFN i PA-MSHA indukuje štetne efekte u koncentracijama u kojima pojedinačni imunomodulatori nisu ispoljili štetan efekat (Slika 23A, B). Dok su najveće koncentracije bez štetnog efekta pojedinačno primenjenih SFN i PA-MSHA, iznosile 3 µg/ml i 0,3%, u kombinovanom tretmanu je najveća koncentracija bez štetnog efekta SFN bila 1 µg/ml, odnosno 0,1% PA-MSHA. SFN i PA-MSHA se mogu bezbedno kombinovati u koncentraciji od 5 µg/ml SFN i do 0,1% PA-MSHA, odnosno 0,3% PA-MSHA i do 1 µg/mL SFN (Slika 23C). Pri kombinaciji većih koncentracija imunomodulatra je najpre uočen uticaj na razvoj mehura, a potom i uticaj na resorpciju žumanceta i pojava nekroze

jetre, kao indikatora hepatotoksičnosti (Slika 22C, D). Sa druge strane, ni u jednoj primenjenoj kombinaciji ispitivanih imunomodulatoara nije uočena pojava perikardijalnog edema, odnosno znakova kardiotoxičnosti. Efekat na preživljavanje embriona (letalni efekat) bio je konstatovan samo pri koncentracijama SFN $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ i PA-MSHA $\geq 0,25\%$, ali je preživljavanje embriona u svim ispitivanim kombinacijama bilo veće od 50% (Slika 23A).

A) Dose-dependent toxicity in the zebrafish (*Danio rerio*) model



B) Survival

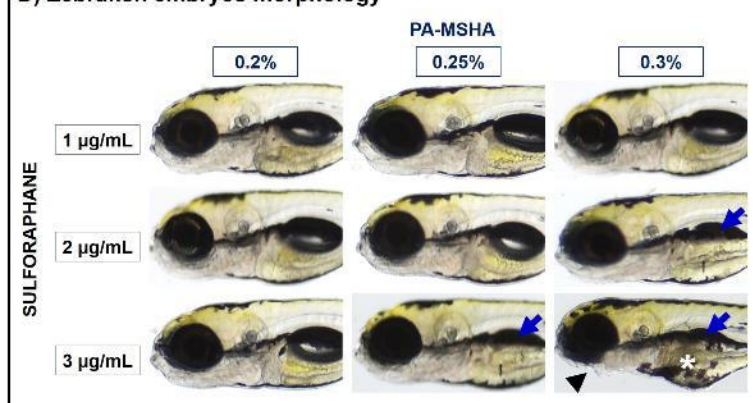
SFN	PA-MSHA					
	0.05%	0.1%	0.15%	0.2%	0.25%	0.3%
0.5 $\mu\text{g/mL}$	100%	100%	100%	100%	100%	100%
1 $\mu\text{g/mL}$	100%	100%	100%	100%	100%	100%
2 $\mu\text{g/mL}$	100%	100%	100%	100%	100%	100%
3 $\mu\text{g/mL}$	100%	100%	100%	100%	100%	100%
4 $\mu\text{g/mL}$	100%	100%	100%	100%	100%	80%
5 $\mu\text{g/mL}$	100%	100%	100%	80%	95%	55%

C) Inner organs toxicity

SFN	PA-MSHA					
	0.05%	0.1%	0.15%	0.2%	0.25%	0.3%
0.5 $\mu\text{g/mL}$	100%	100%	100%	100%	100%	100%
1 $\mu\text{g/mL}$	100%	100%	100%	100%	100%	100%
2 $\mu\text{g/mL}$	100%	100%	100%	100%	100%	100%
3 $\mu\text{g/mL}$	100%	100%	100%	100%	100%	100%
4 $\mu\text{g/mL}$	100%	100%	100%	95%	20%	0%
5 $\mu\text{g/mL}$	100%	100%	85%	20%	0%	0%

Alive embryos (%)
Normally developed embryos (%)

D) Zebrafish embryos morphology



Slika 23. Akutna toksičnost kombinacije SFN i PA-MSHA na embrione zebrice nakon petodnevnog tretmana. (A) Uticaj različitih kombinacija SFN i PA-MSHA na preživljavanje i pojavu štetnih efekata; (B) preživljavanje embriona; (C) učestalost štetnih efekata; (D) izgled embriona zebrice nakon petodnevnog tretmana smešom SFN i PA-MSHA, i efekti na razvoj mehura za plivanje (plava strelica), pojavu malformaciju donje vilice (vrh crne strelice) i redukovanu resorpciju i pojavu nekroze žumanceta (zvedica)

4.3.1.3.1. Modelovanje odnosa koncentracija-odgovor

Od svih praćenih efekata, analizom odnosa koncentracija-odgovor (BMC modelovanje) za kombinovanu primenu imunomodulatora uočen je samo efekat na pojavu malformacija embriona (teratogenost), pri čemu su dobijeni sledeći BMC intervali:

1. SFN: 4,69 - 5,67 $\mu\text{g/mL}$
2. PA-MSHA: 5,92 x 10⁶ - 8,59 x 10⁶ ćelija/mL

Dobijena BMCL koncentracija za SFN (4,69 $\mu\text{g/mL}$) pri kombinovanom tretmanu je viša od BMCL koncentracije SFN pri pojedinačnoj primeni (3,32 $\mu\text{g/mL}$) za efekat

malformacije embriona. Za isti efekat, BMCL koncentracija PA-MSHA ($5,92 \times 10^6$) niža je od BMCL koncentracije utvrđene za teratogene efekte pojedinačne primene PA-MSHA ($6,15 \times 10^6$).

4.3.2. Rezultati na modelu pacova

4.3.2.1. Uticaj na unos vode i hrane

4.3.2.1.1. Sulforafan

Unos vode i hrane i procentualna razlika u odnosu na kontrolu, praćena je u pet vremenskih perioda i to, nakon 1, 7, 14, 21, i 28. dana tretmana. Prvo je posmatran uticaj rastućih doza na unos vode i hrane kod mužjaka pacova. Tabela 12 opisuje promene u unosu vode u odnosu na kontrolu, pri čemu je u svim vremenskim periodima, sa izuzetkom vremenskog perioda 3 (14 dana nakon početka tretmana) uočen statistički značajan porast. Najveća razlika uočena je nakon 21. dana kada su tretirani pacovi u grupi SFN 1 i SFN 3 uneli 135% više vode od kontrolne grupe, a pacovi u grupi SFN 2, 76% više. Poslednjeg dana eksperimenta, mužjaci pacova u grupi SFN 2 i SFN 3 uneli su 19% više u odnosu na kontrolu. Važno je istaći i da primenjena doza SFN nije uticala na količinu vode koju su mužjaci pacova uneli u posmatranim vremenskim periodima (Tabela 12). Unos hrane u kontrolnoj i grupama tretiranim rastućim dozama SFN dat je u Tabeli 13. Dobijeni rezultati ukazuju na povećan unos hrane u tretiranim grupama, koji je bio viši u odnosu na kontrolu u svim vremenskim periodima, ali je najznačajnija razlika, ponovo, uočena nakon 3 nedelje tretmana. Dozna-zavisnost, takođe, nije uočena.

Tabela 12. Uticaj rastućih doza sulforafana na unos vode (ml/dan) kod mužjaka pacova nakon 28 dana oralne ekspozicije

	Kontrola	SFN 1	SFN 2	SFN 3
1. dan % u odnosu na kontrolu	$34 \pm 3,4$ /	$50 \pm 1,6$ **** 47%	$50 \pm 3,7$ **** 47%	$50 \pm 4,7$ **** 47%
7. dan % u odnosu na kontrolu	$38 \pm 3,2$ /	$40 \pm 1,9$ 5%	$50 \pm 4,8$ **** 31%	$50 \pm 2,1$ **** 31%
14. dan % u odnosu na kontrolu	$42 \pm 2,2$ /	$40 \pm 0,9$ -5%	$41 \pm 8,5$ -3%	$46 \pm 1,8$ 9%
21. dan % u odnosu na kontrolu	$17 \pm 0,74$ /	$40 \pm 0,84$ **** 135%	$30 \pm 1,6$ **** 76%	$40 \pm 1,5$ **** 135%
28. dan % u odnosu na kontrolu	$42 \pm 2,1$ /	$40 \pm 1,6$ -5%	$50 \pm 2,6$ **** 19%	$50 \pm 1,9$ **** 19%

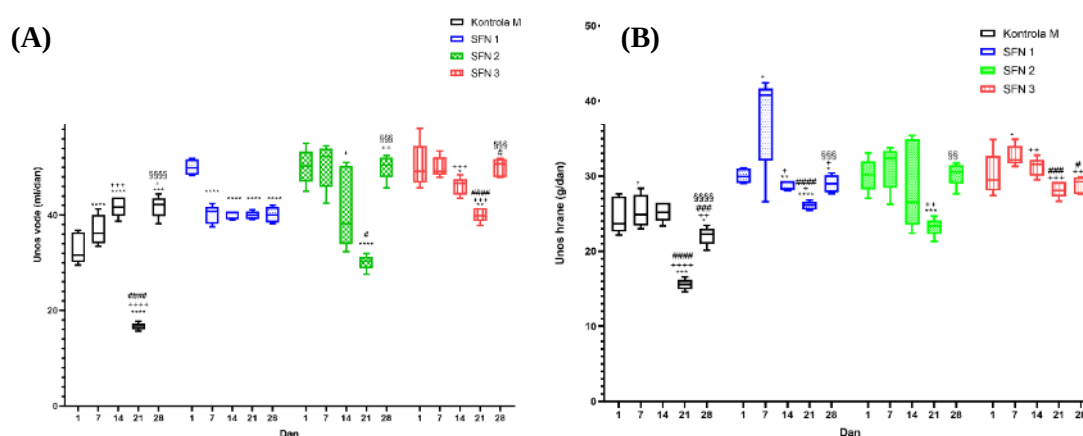
**** $p < 0,0001$ (u poređenju sa kontrolom); Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti $\pm$ standardne devijacije, broj životinja u grupi, $n = 5$. SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m/dan); SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m/dan); SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m/dan)

Tabela 13. Uticaj rastućih doza sulforafana na unos hrane (g/dan) kod mužjaka pacova nakon 28 dana oralne ekspozicije

	Kontrola	SFN 1	SFN 2	SFN 3
1. dan % u odnosu na kontrolu	25 ± 2,5 /	30 ± 0,98 ** 20%	30 ± 2,2 ** 20%	30 ± 2,8 ** 20%
7. dan % u odnosu na kontrolu	26 ± 2,2 /	38 ± 6,4 **** 46%	31 ± 3 * 19%	33 ± 1,4 ** 27%
14. dan % u odnosu na kontrolu	26 ± 1,3 /	29 ± 0,65 11%	29 ± 5,9 11%	31 ± 1,2 ** 19%
21. dan % u odnosu na kontrolu	15 ± 0,69 /	26 ± 0,55 **** 73%	23 ± 1,2 **** 53%	28 ± 1,1 **** 87%
28. dan % u odnosu na kontrolu	22 ± 1,1 /	29 ± 1,2 **** 32%	30 ± 1,6 **** 36%	29 ± 1,1 **** 32%

* p<0,05; ** p<0,01; **** p<0,0001 (u poređenju sa kontrolom); Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, n = 5. SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m/dan); SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m/dan); SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m/dan)

Dodatno, na slici 24 prikazane su promene u unosu vode i hrane u kontrolnoj grupi, kao i kod tretiranih životinja između svih 5 posmatranih vremenskih perioda, pojedinačno, dobijene korišćenjem ANOVA testa sa ponovljenim merenjem i LSD post hoc testa (Slika 24). U grupi SFN 1, primećeno je značajno smanjenja unosa vode samo nakon 1. dana, dok se u SFN 2 grupi, blago smanjenje u unosu vode uočava nakon 14 dana (p<0,05 u odnosu na dan 7.), a značajno smanjenje nakon 3 nedelje tretmana (p<0,0001 u odnosu na dan 1). U odnosu na 1. i 7. dan, pacovi u grupi SFN 3 unosili su manju količinu vode nakon 14. i 21. dana tretmana, a istu nakon 28. dana. Unos hrane varirao je tokom trajanja eksperimenata u svim vremenskim periodima, ali je bio veći u odnosu na kontrolu. U SFN 1 grupi, uočava se značajno povećanje unosa hrane nakon 7 dana u odnosu na 1. dan (p<0,05), a potom smanjenje nakon 14, 21, i 28. dana tretmana. Najmanju količinu hrane pacovi su uneli nakon 21. dana, statistički značajno manje u odnosu na sve druge merne periode. S druge strane, unos hrane u SFN 2 grupi pokazuje manje promene. Konačno, u grupi SFN 3 vidimo blagi porast unosa nakon 7 dana (u odnosu na dan 1), a potom konstantno smanjenje unosa hrane, nakon 14, 21, i 28 dana (u odnosu na dan 1 i dan 7).



Slika 24. Unos vode (ml/dan) (A) i hrane (g/dan) (B) nakon subakutne ekspozicije mužjaka pacova rastućim dozama sulforafana

Eksperimentalne grupe: Kontrola M-mužjaci: DMSO; SFN 1: sulforafan; 0,5 mg/kg t.m./dan; SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m./dan); SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m./dan). * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001,

**** $p < 0,0001$ (u odnosu na 1. dan eksperimenta). + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$; +++++ $p < 0,0001$ (u odnosu na 7. dan eksperimenta), # $p < 0,05$, ##### $p < 0,0001$ (u odnosu na 14. dan eksperimenta), §§§ $p < 0,001$; §§§§ $p < 0,001$ (u odnosu na 21. dan eksperimenta). Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa ponovljenim merenjem i LSD post hoc testom. Dijagram predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), linija unutar okvira označava srednju vrednost, a minimalne i maksimalne vrednosti unutar grupe naglašene su krajnjim ivicama iznad dijagrama

Unos vode i hrane i procentualna razlika u odnosu na kontrolu, praćena je i kod ženki pacova. Tabela 14 opisuje promene u unosu vode u odnosu na kontrolu, gde se ne uočava ni pozitivan ni negativan trend, odnosno unos vode varirao je u svim grupama i u svim posmatranim vremenskim periodima. Najveća razlika u unosu vode zabeležena je nakon 28 dana tretmana kada su tretirane životinje u SFN 2 i SFN 3 grupi unele, 33% i 54% više vode u odnosu na kontrolu, redom (Tabela 14). Kod ženki pacova nije pokazana značajna razlika u unosu hrane između kontrolne i SFN-tretiranih grupa. Statistički značajna razlika uočena je nakon jednog dana u SFN 3 grupi (- 6% u odnosu na kontrolu, $p < 0,05$) i nakon 28 dana tretmana u SFN 2 (+ 48% u odnosu na kontrolu, $p < 0,0001$) i SFN 3 grupi (+ 26% u odnosu na kontrolu, $p < 0,01$) (Tabela 15).

Tabela 14. Uticaj rastućih doza sulforafana na unos vode (ml/dan) ženki pacova nakon oralne subakutne ekspozicije

	Kontrola	SFN 1	SFN 2	SFN 3
1. dan % u odnosu na kontrolu	46 ± 3,4 /	50 ± 2,4 * 9%	45 ± 2,2 -3%	60 ± 4,2 **** 30%
7. dan % u odnosu na kontrolu	33 ± 1 /	45 ± 2,3 **** 36%	40 ± 2 **** 21%	30 ± 1,6 ** -9%
14. dan % u odnosu na kontrolu	38 ± 0,6 /	30 ± 1,6 **** -21%	40 ± 1,7 5%	40 ± 2,3 5%
21. dan % u odnosu na kontrolu	50 ± 3,4 /	40 ± 2,4 **** -20%	34 ± 4,3 **** -32%	60 ± 2,6 *** 20%
28. dan % u odnosu na kontrolu	33 ± 1,3 /	30 ± 2,2 -9%	44 ± 2,7 *** 33%	51 ± 7,6 **** 54%

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (u poređenju sa kontrolom); Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, $n = 5$. SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m/dan); SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m/dan); SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m/dan)

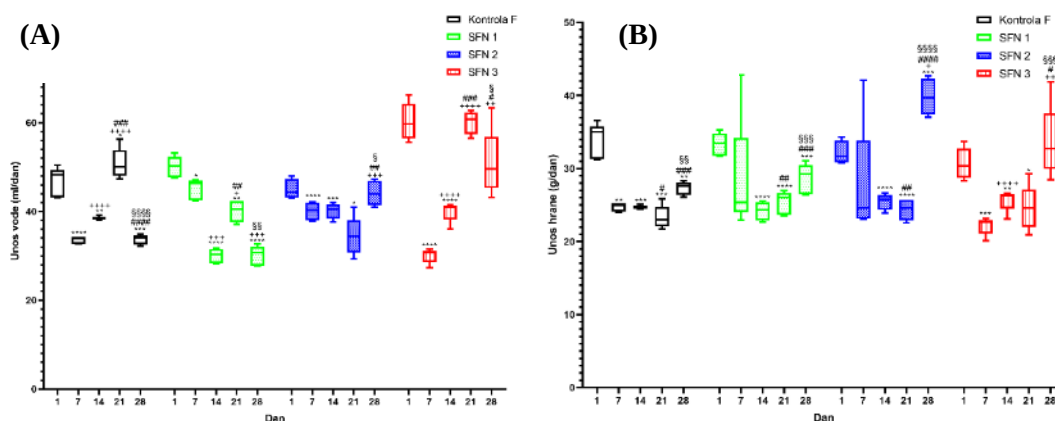
Tabela 15. Uticaj rastućih doza sulforafana na unos hrane (g/dan) ženki pacova nakon oralne subakutne ekspozicije

	Kontrola	SFN 1	SFN 2	SFN 3
1. dan % u odnosu na kontrolu	33 ± 2,5 /	33 ± 1,6 /	32 ± 1,6 -3%	31 ± 2,1 * -6%
7. dan % u odnosu na kontrolu	26 ± 3 /	28 ± 8,1 8%	28 ± 8,1 8%	22 ± 1,2 -15%
14. dan % u odnosu na kontrolu	25 ± 0,39 /	24 ± 1,3 -4%	25 ± 1,1 /	26 ± 1,5 4%
21. dan % u odnosu na kontrolu	23 ± 1,6 /	25 ± 1,6 9%	24 ± 1,5 4%	25 ± 3,1 9%
28. dan % u odnosu na kontrolu	27 ± 1 /	29 ± 2,1 7%	40 ± 2,5 **** 48%	34 ± 5 ** 26%

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ (u poređenju sa kontrolom); Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti $\pm$ standardne devijacije, broj životinja u grupi, $n = 5$. SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m./dan); SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m./dan); SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m./dan)

ANOVA sa ponovljenim merenjem i LSD post hoc testom korišćena je za praćenje promena u unosu vode i hrane unutar svake od ispitivanih grupa, pojedinačno i to u svih 5 posmatranih vremenskih intervala (Slika 25). Unos vode varirao je u svim grupama i u svim vremenskim periodima. U kontrolnoj grupi najviši unos vode zabeležen je nakon 21. dana tretmana, a najniži nakon 7. i 28. dana. U SFN 1 grupi, značajno snižen unos vode primećen je u svim vremenskim periodima (u odnosu na dan 1), pri čemu je najniži unos zabeležen nakon 14 i 28 dana tretmana ($p < 0,0001$). U SFN 2 grupi, zabeleženo je smanjenje unosa voda u odnosu na 1. dan u tri vremenska perioda i to 7., 14., i 21. dana tretmana. U SFN 3 grupi uočava se značajno smanjenje između 1. i 7. dana tretmana, a potom postepeni porast.

Unos hrane kod ženki pacova varirao je u okviru grupa tokom trajanja eksperimenata u svim vremenskim periodima, ali se nije statistički značajno razlikovao od kontrole. U SFN 1 grupi, uočava se snižen unos hrane nakon 14, 21 i 28 dana u odnosu na 1. dan, ali porast nakon 21. i 28. dana u odnosu na dan 14. Sličan trend je uočen i u grupi 2 (SFN 2) pri čemu su ženke pacova na kraju eksperimenta (dan 28) unele najveću količinu hrane. Konačno, u grupi SFN 3 uočava se smanjenje unosa hrane između 1. i 7. dana tretmana, a potom konstantni porast unosa hrane (Slika 25).



Slika 25. Unos vode (ml/dan) (A) i hrane (g/dan) (B) nakon subakutne ekspozicije ženki pacova rastućim dozama sulforafana

Eksperimentalne grupe: Kontrola F-ženke; SFN 1: sulforafan; 0,5 mg/kg t.m./dan; SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m./dan); SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m./dan). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (u odnosu na 1. dan eksperimenta). + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$; ++++ $p < 0,0001$ (u odnosu na 7. dan eksperimenta), # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ (u odnosu na 14. dan eksperimenta), § $p < 0,05$, §§ $p < 0,01$, §§§ $p < 0,001$; §§§§ $p < 0,0001$ (u odnosu na 21. dan eksperimenta). Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa ponovljenim merenjem i LSD post hoc testom. Dijagram predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), linija unutar okvira označava srednju vrednost, a minimalne i maksimalne vrednosti unutar grupe naglašene su krajnjim ivicama iznad dijagrama

4.3.2.1.2. Inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Unos vode i hrane i procentualna razlika u odnosu na kontrolu, praćena je i kod mužjaka pacova tretiranih rastućim dozama PA-MSHA. Tabela 16 opisuje promene u unosu vode u odnosu na kontrolu. U svim vremenskim periodima, sa izuzetkom 28. dana, uočen je porast unosa vode u svim tretiranim grupama u odnosu na kontrolu. Nakon 3 nedelje tretmana, mužjaci pacova u grupama PA-MSHA 1, PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3, uneli su 135%, 253% i 205% više vode u odnosu na kontrolu, redom (Tabela 16). Unos hrane, bio je, takođe, značajno viši kod tretiranih životinja u odnosu na kontrolu. Najveća razlika uočena je nakon 3 nedelje tretmana, u sve 3 tretirane grupe (Tabela 17).

Tabela 16. Uticaj rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na unos vode (ml/dan) kod mužjaka pacova nakon subakutne ekspozicije

	Kontrola	PA-MSHA 1	PA-MSHA 2	PA-MSHA 3
1. dan	34 ± 3,4	50 ± 5,2 **	81 ± 9,4 ****	75 ± 9 ****
% u odnosu na kontrolu	/	47%	138%	120%
7. dan	38 ± 3,2	50 ± 4,5 ***	60 ± 4,7 ****	61 ± 6,4 ****
% u odnosu na kontrolu	/	31%	58%	60%
14. dan	42 ± 2,2	50 ± 3,9 **	60 ± 5 ****	50 ± 4,8 **
% u odnosu na kontrolu	/	19%	42%	19%
21. dan	17 ± 0,74	40 ± 3 ****	60 ± 5,3 ****	52 ± 2,8 ****
% u odnosu na kontrolu	/	135%	253%	205%
28. dan	42 ± 2,1	40 ± 2,8	40 ± 3,3	44 ± 3,2
% u odnosu na kontrolu	/	-5%	-5%	-5%

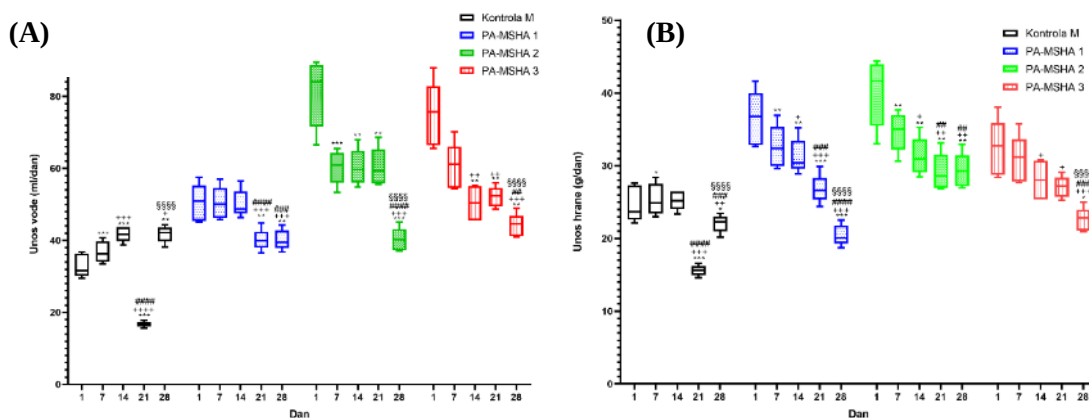
** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001 (u poređenju sa kontrolom); Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference, LSD*). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, n = 5. PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,09 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,8 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,36 x 10⁹ ćelija/ml)

Tabela 17. Uticaj rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na unos hrane (g/dan) kod mužjaka pacova nakon subakutne ekspozicije

	Kontrola	PA-MSHA 1	PA-MSHA 2	PA-MSHA 3
1. dan	25 ± 2,5	36 ± 3,7 ***	40 ± 4,7 ****	32 ± 3,9 **
% u odnosu na kontrolu	/	44%	60%	28%
7. dan	26 ± 2,2	33 ± 2,9 ***	35 ± 2,7 ****	31 ± 3,3 **
% u odnosu na kontrolu	/	27%	35%	19%
14. dan	26 ± 1,3	31 ± 2,4 ***	31 ± 2,6 ***	28 ± 2,6
% u odnosu na kontrolu	/	19%	19%	8%
21. dan	15 ± 0,69	27 ± 2 ****	29 ± 2,6 ****	27 ± 1,5 ****
% u odnosu na kontrolu	/	80%	93%	80%
28. dan	22 ± 1,1	20 ± 1,4	29 ± 2,4 ****	23 ± 1,6
% u odnosu na kontrolu	/	-10%	32%	4%

** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001 (u poređenju sa kontrolom); Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference, LSD*). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, n = 5. PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,09 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,18 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,36 x 10⁹ ćelija/ml)

Kao što je prethodno objašnjeno, praćenja je promena u unosu vode i hrane unutar svih eksperimentalnih grupa i u svih pet posmatranih vremenskih perioda, pojedinačno (Slika 26). Unos vode u kontrolnoj grupi pokazuje blagi porast između prvog i 14 dana, a potom, naglo smanjenje 21. dana tretmana. Između 21. i 28. dana, beleži se statistički značajan porast unosa vode. U PA-MSHA 1 grupi, unos vode bio je konstantan (bez značajne razlike) od 1. do 21. dana tretmana, kada dolazi do statistički značajnog smanjenja. U PA-MSHA 2 grupi, zabeležno je smanjenje unosa voda u odnosu na 1. dan u sva četiri vremenska perioda (7, 14, 21. i 28. dan). Pacovi su unosili istu količinu vode između 7. i 21. dana, dok je 28. dana došlo do značajnog smanjenja unosa u odnosu na sve prethodno praćene vremenske periode. Slično tome, pacovi tretirani najvišom dozom PA-MSHA (PA-MSHA 3) uneli su najviše vode 1. dana, a potom se unos postepeno smanjivao, pa je nakon 28. dana tretmana bio najniži. Mužjaci pacova tretirani PA-MSHA unosili su više hrane od kontrole tokom trajanja eksperimenta pri čemu je promena unosa hrane pratila isti trend u svim tretiranim grupama bez obzira na primenjenu dozu. Prvog dana eksperimenta pacovi su uneli najviše hrane, a potom se količina unete hrane smanjivala tokom vremena, da bi na kraju eksperimenta, pacovi uneli najmanje hrane (Slika 26).



Slika 26. Unos vode (ml/dan) (A) i hrane (g/dan) (B) nakon subakutne ekspozicije mužjaka pacova rastućim dozama inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

Eksperimentalne grupe: Kontrola M-mužjaci; PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,36 \times 10^9$ ćelija/ml). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (u odnosu na 1. dan eksperimenta). + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$; +++++ $p < 0,0001$ (u odnosu na 7. dan eksperimenta), # $p < 0,01$, ## $p < 0,001$, ### $p < 0,0001$ (u odnosu na 14. dan eksperimenta), §§§§ $p < 0,0001$ (u odnosu na 21. dan eksperimenta). Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa ponovljenim merenjem i LSD *post hoc* testom. Dijagram predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), linija unutar okvira označava srednju vrednost, a minimalne i maksimalne vrednosti unutar grupe naglašene su krajnjim ivicama iznad dijagrama

Unos vode i hrane i procentualna razlika u odnosu na kontrolu, praćena je i kod ženki pacova tretiranih rastućim dozama PA-MSHA. Tabela 18 opisuje promene u unosu vode u odnosu na kontrolu gde se vidi značajna razlika u svim vremenskim intervalima sa izuzetkom 14. dana (Tabela 18). Kod ženki pacova unos hrane razlikovao se od kontrole u grupi PA-MSHA 3 nakon 1. i 7. dana tretmana i to za 18%, odnosno 15%. Nakon 14 dana, jedina statistički značajna razlika uočena je u PA-MSHA 2 grupi (-12% u odnosu na kontrolu, $p < 0,01$), a nakon 21. dana u PA-MSHA 1 grupi (+ 26% u odnosu na kontrolu, $p < 0,0001$). Konačno, poslednjeg dana eksperimenta, zabeležen je snižen unos u sve tri grupe pacova tretirane PA-MSHA, ali grupa PA-MSHA 1 nije pokazala statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (Tabela 19).

Tabela 18. Uticaj rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na unos vode (ml/dan) kod ženki pacova nakon subakutne ekspozicije

	Kontrola	PA-MSHA 1	PA-MSHA 2	PA-MSHA 3
1. dan % u odnosu na kontrolu	46 ± 3,4 /	40 ± 2,1 * -13%	40 ± 4,7 * -13%	56 ± 4,6 *** 22%
7. dan % u odnosu na kontrolu	33 ± 1 /	40 ± 3,7 ** 21%	40 ± 4 ** 21%	50 ± 4 **** 51%
14. dan % u odnosu na kontrolu	38 ± 0,6 /	40 ± 1,6 5%	40 ± 3,8 5%	40 ± 2,8 5%
21. dan % u odnosu na kontrolu	50 ± 3,4 /	60 ± 2,6 **** 20%	50 ± 3,8 /	40 ± 2,1 **** -20%
28. dan % u odnosu na kontrolu	33 ± 1,3 /	55 ± 2,6 **** 67%	50 ± 4,1 **** 51%	60 ± 2,7 **** 82%

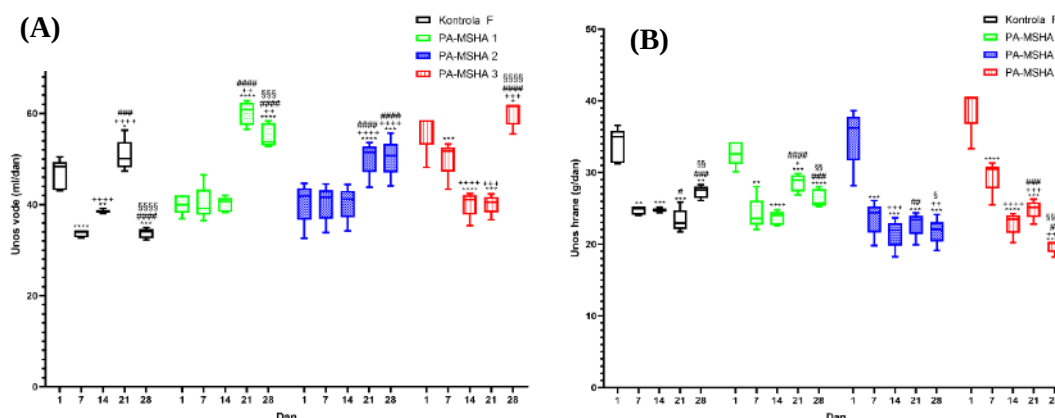
* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001 (u poređenju sa kontrolom); Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, n = 5. PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,09 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,18 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,36 x 10⁹ ćelija/ml)

Tabela 19. Uticaj rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na unos hrane (g/dan) kod ženki pacova nakon subakutne ekspozicije

	Kontrola	PA-MSHA 1	PA-MSHA 2	PA-MSHA 3
1. dan % u odnosu na kontrolu	33 ± 2,5 /	33 ± 1,7 /	35 ± 4 6%	39 ± 3,2 ** 18%
7. dan % u odnosu na kontrolu	26 ± 3 /	24 ± 2,3 -8%	24 ± 2,3 -8%	30 ± 2,3 * 15%
14. dan % u odnosu na kontrolu	25 ± 0,39 /	24 ± 0,97 -4%	22 ± 2 ** -12%	23 ± 1,6 -8%
21. dan % u odnosu na kontrolu	23 ± 1,6 /	29 ± 1,2 **** 26%	23 ± 1,7 /	25 ± 1,3 9%
28. dan % u odnosu na kontrolu	27 ± 1 /	26 ± 1,2 -4%	22 ± 1,8 **** -19%	20 ± 0,9 **** -26%

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001 (u poređenju sa kontrolom); Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, n = 5. PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,09 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,18 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,36 x 10⁹ ćelija/ml)

ANOVA sa ponovljenim merenjem i LSD *post hoc* testom korišćena je za praćenje promena u unosu vode i hrane u kontrolnoj grupi, kao i u grupama tretiranih životinja u svih pet posmatranih vremenskih perioda, pojedinačno (Slika 27). Unos vode u grupama PA-MSHA 1 i PA-MSHA 2 pokazuje isti trend. U grupi PA-MSHA 1, na kraju eksperimenta dolazi do smanjenja unosa vode u odnosu na dan 21 (p<0,001), dok se ova promena ne uočava u grupi PA-MSHA 2. U PA-MSHA 3 grupi zabeležen je snižen unos u vremenskim periodima 2, 3 i 4 u odnosu na prvi vremenski period, a povećan u petom vremenskom periodu, odnosno na kraju eksperimenta. Unos hrane kod ženki pacova varirao je u okviru svake grupe tokom trajanja eksperimenta u svim vremenskim periodima (Slika 27).



Slika 27. Unos vode (ml/dan) (A) i hrane (g/dan) (B) nakon subakutne ekspozicije ženki pacova rastućim dozama inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

Ekperimentalne grupe: Kontrola F-ženke; PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,36 \times 10^9$ ćelija/ml). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (u odnosu na 1. dan eksperimenta), + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$; ++++ $p < 0,0001$ (u odnosu na 7. dan eksperimenta), # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ (u odnosu na 14. dan eksperimenta), § $p < 0,05$, §§ $p < 0,01$, §§§ $p < 0,001$, §§§§ $p < 0,0001$ (u odnosu na 21. dan eksperimenta). Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa ponovljenim merenjem i LSD post hoc testom. Dijagram predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), linija unutar okvira označava srednju vrednost, a minimalne i maksimalne vrednosti unutar grupe naglašene su krajnjim ivicama iznad dijagrama

4.3.2.1.3. Kombinovana primena imunomodulatora

Posmatran je uticaj rastućih doza kombinovane primene SFN i PA-MSHA (MIX 1, MIX 2, MIX 3) na unos vode i hrane i izračunata je procentualna razlika u odnosu na kontrolu, u pet vremenskih perioda i to, nakon 1, 7, 14, 21. i 28. dana tretmana. Tabela 20 opisuje promene u unosu vode u odnosu na kontrolu, dok tabela 21 opisuje promene u unosu hrane u odnosu na kontrolu kod mužjaka pacova. Kombinovana primena dovela je do najvećeg porasta u unosu vode nakon 3 nedelje tretmana kada su životinje u MIX 1, MIX 2 i MIX 3 grupi unele 135%, 182% i 194% više vode u odnosu na kontrolu, redom. U vezi unosa hrane, nakon prvog i 21. dana uočen je najveći porast unosa hrane u sve tri MIX grupe u odnosu na kontrolu. Posle četiri nedelje tretmana, statistički značajan porast je uočen u MIX 1 i MIX 2 grupi, za 23% i 18%, redom, ali ne i u MIX 3 grupi (Tabela 21).

Tabela 20. Uticaj kombinovane primene rastućih doza sulforafana i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na unos vode (ml/dan) kod mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije

	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3
1. dan				
% u odnosu na kontrolu	$34 \pm 3,4$ /	$50 \pm 4,2$ **** 47%	$51 \pm 6,5$ **** 50%	$50 \pm 2,7$ **** 47%
7. dan				
% u odnosu na kontrolu	$38 \pm 3,2$ /	$50 \pm 3,4$ *** 31%	$70 \pm 6,4$ **** 84%	$50 \pm 3,4$ *** 31%
14. dan				
% u odnosu na kontrolu	$42 \pm 2,2$ /	40 ± 2 -5%	$46 \pm 3,5$ * 9%	$50 \pm 3,4$ *** 19%
21. dan				
% u odnosu na kontrolu	$17 \pm 0,74$ /	$40 \pm 1,6$ **** 135%	$48 \pm 3,4$ **** 182%	$50 \pm 1,9$ **** 194%
28. dan				
% u odnosu na kontrolu	$42 \pm 2,1$ /	$30 \pm 1,1$ **** -29%	$50 \pm 3,1$ **** 19%	$40 \pm 2,5$ -5%

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (u poređenju sa kontrolom). Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fisherovim testom najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least

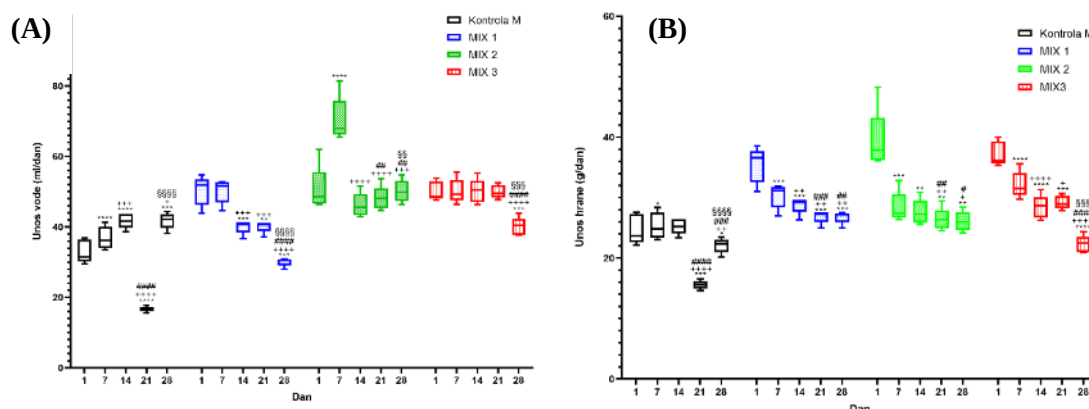
Significant Difference, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti $\pm$ standardne devijacije, broj životinja u grupi, $n = 5$. MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + $0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + $0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + $0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); SFN - sulforafan; PA-MSHA - inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Tabela 21. Uticaj kombinovane primene rastućih doza sulforafana i inaktivisane bakterije inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* na unos hrane (g/dan) kod mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije

	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3
1. dan	25 $\pm$ 2,5	35 $\pm$ 2,9 ****	39 $\pm$ 5,1 ****	37 $\pm$ 2 ****
% u odnosu na kontrolu	/	40%	56%	48%
7. dan	26 $\pm$ 2,2	30 $\pm$ 2,1 **	28 $\pm$ 2,6	32 $\pm$ 2,2 ***
% u odnosu na kontrolu	/	15%	8%	23%
14. dan	26 $\pm$ 1,3	29 $\pm$ 1,4 **	28 $\pm$ 2,1	28 $\pm$ 1,9 *
% u odnosu na kontrolu	/	11%	8%	8%
21. dan	15 $\pm$ 0,69	27 $\pm$ 1,1 ****	26 $\pm$ 1,9 ****	29 $\pm$ 1,1 ****
% u odnosu na kontrolu	/	80%	73%	93%
28. dan	22 $\pm$ 1,1	27 $\pm$ 1 ****	26 $\pm$ 1,6 ****	22 $\pm$ 1,4
% u odnosu na kontrolu	/	23%	18%	/

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,001$ (u poređenju sa kontrolom). Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti $\pm$ standardne devijacije, broj životinja u grupi, $n = 5$. MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + $0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + $0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + $0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); SFN - sulforafan; PA-MSHA - inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Slika 28 pokazuje promene u unosu vode i hrane unutar kontrolne, kao i tretiranih grupa mužjaka pacova u svih pet posmatranih vremenskih perioda, pojedinačno. U grupi MIX 1, primećen je značajno smanjenje unosa vode nakon 7 dana, a potom i na kraju eksperimenta (dan 28) u odnosu na 14. i 21. dan. U MIX 2 grupi, značajan porast zabeležen je nakon 7 dana u odnosu na prvi dan a potom smanjenje u unosu vode (dan 14). Nakon tri i četiri nedelje tretmana uočava se postepen porast unosa vode u odnosu na 14. dan ($p < 0,01$). Na kraju, u grupi MIX 3 unos vode bio je konstantan do 28. dana, kada se beleži statistički značajno smanjenje. Unos hrane varirao je tokom trajanja eksperimenata u svim vremenskim periodima, i svim tretiranim grupama, ali je bio veći u odnosu na kontrolu pri čemu je u MIX 3 grupi zabeleženo najviše promena u unosu hrane između praćenih perioda (Slika 28).



Slika 28. Unos vode (ml/dan) (A) i hrane (g/dan) (B) nakon subakutne ekspozicije mužjaka pacova kombinovanoj primeni sulforafana i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

Eksperimentalne grupe: Kontrola M-mužjaci; MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + $0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + $0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + $0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); SFN - sulforafan; PA-MSHA - inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (u odnosu na 1. dan eksperimenta). + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$; +++++ $p < 0,0001$ (u odnosu na 7. dan eksperimenta), # $p < 0,05$, ##### $p < 0,0001$ (u odnosu na 14. dan eksperimenta), §§§ $p < 0,001$; §§§§ $p < 0,0001$ (u odnosu na 21. dan eksperimenta). Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa ponovljenim merenjem i LSD post hoc testom. Dijagram predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), linija unutar okvira označava srednju vrednost, a minimalne i maksimalne vrednosti unutar grupe naglašene su krajnjim ivicama iznad dijagrama

Takođe, praćena je i promena unosa hrane i vode kod ženki pacova tretiranih kombinacijom SFN i PA-MSHA u 3 dozna nivoa. Unos vode bio je povišen za 33% (MIX 1 i MIX 2) i 51% (MIX 3) na kraju eksperimenta (28. dan) u odnosu na kontrolu (Tabela 22). Primljeni tretman nije značajno uticao na unos hrane. Povećanje je viđeno samo u MIX 3 grupi prvog dana eksperimenta (15%, $p < 0,05$) i nakon 21. dana u grupama MIX 1 (35%, $p < 0,0001$) i MIX 3 (39%, $p < 0,0001$). Suprotno tome, nakon 7. i 28. dana, primećeno je smanjenje u količini unosa hrane kod tretiranih ženki pacova (Tabela 23).

Tabela 22. Uticaj kombinovane primene rastućih doza sulforafana i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na unos vode (ml/dan) kod ženki pacova nakon 28 dana ekspozicije

	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3
1. dan % u odnosu na kontrolu	46 ± 3,4 /	40 ± 2,8 * -13%	50 ± 2,1 9%	51 ± 7,9 11%
7. dan % u odnosu na kontrolu	33 ± 1 /	40 ± 2,8 *** 21%	40 ± 1,7 *** 21%	36 ± 4,2 9%
14. dan % u odnosu na kontrolu	38 ± 0,6 /	38 ± 3,8 /	40 ± 2 5%	42 ± 4,3 * 10%
21. dan % u odnosu na kontrolu	50 ± 3,4 /	40 ± 3,8 *** -20%	40 ± 1,7 *** -20%	40 ± 4,3 *** -20%
28. dan % u odnosu na kontrolu	33 ± 1,3 /	44 ± 4,7 *** 33%	44 ± 2,1 *** 33%	50 ± 5,6 **** 51%

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (u poređenju sa kontrolom). Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, n = 5. MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + $0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + $0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + $0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); SFN - sulforafan; PA-MSHA - inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

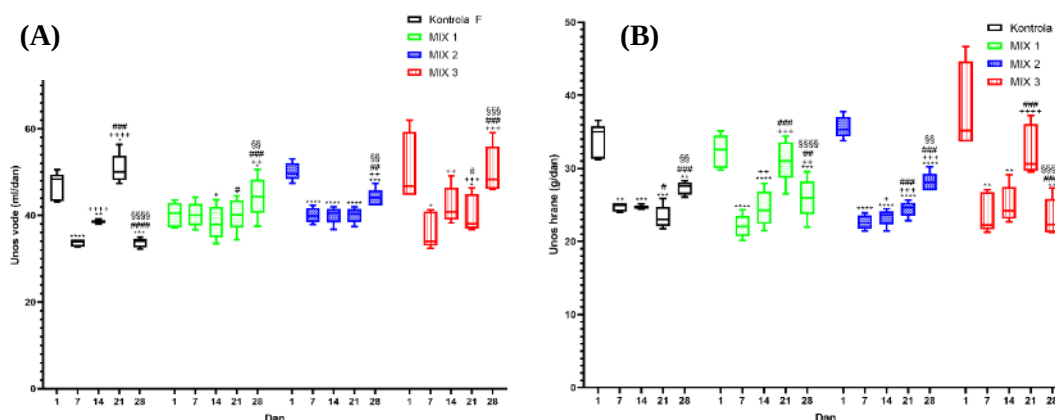
Tabela 23. Uticaj kombinovane primene rastućih doza sulforafana i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na unos hrane (g/dan) kod ženki pacova nakon 28 dana ekspozicije

	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3
1. dan % u odnosu na kontrolu	33 ± 2,5 /	32 ± 2,3 -3%	36 ± 1,5 9%	38 ± 6 * 15%
7. dan % u odnosu na kontrolu	26 ± 3 /	22 ± 1,6 * -15%	23 ± 0,97 * -12%	24 ± 2,7 -8%
14. dan % u odnosu na kontrolu	25 ± 0,39 /	25 ± 2,4 /	23 ± 1,2 -8%	25 ± 2,5 /
21. dan % u odnosu na kontrolu	23 ± 1,6 /	31 ± 2,9 **** 35%	24 ± 1 4%	32 ± 3,4 **** 39%
28. dan % u odnosu na kontrolu	27 ± 1 /	26 ± 2,7 -4%	28 ± 1,3 4%	23 ± 2,6 ** -15%

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$ (u poređenju sa kontrolom). Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti $\pm$ standardne devijacije, broj životinja u grupi, $n = 5$. MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + $0,09 \times 10^9$ ćelije/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + $0,18 \times 10^9$ ćelije/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + $0,36 \times 10^9$ ćelije/ml); SFN - sulforafan; PA-MSHA - inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Slika 29 opisuje promene u unosu vode i hrane u kontrolnoj grupi, kao i kod tretiranih ženki pacova u svih pet posmatranih vremenskih perioda, pojedinačno (Slika 29). Unos vode i hrane varirao je tokom trajanja eksperimenta u svim vremenskim periodima, i svim tretiranim grupama.

MIX 1 i MIX 3 grupa ponašale su se slično u pogledu unosa hrane tokom 28 dana trajanja eksperimenta. Prvi dan ženke pacova unele su najviše hrane, nakon čega sledi naglo smanjenje u unosu (Slika 29). Međutim, kod životinja tretiranih najvišom dozom SFN i PA-MSHA (MIX 3) primećeno je više promena u unosu vode i hrane tokom trajanja eksperimenta.



Slika 29. Unos vode (ml/dan) (A) i hrane (g/dan) (B) nakon subakutne ekspozicije ženki pacova kombinovanoj primeni sulforafana i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

Ekperimentalne grupe: Kontrola F-ženke; MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + $0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + $0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + $0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); SFN - sulforafan; PA-MSHA - inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (u odnosu na 1. dan eksperimenta). + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$, ++++ $p < 0,0001$ (u odnosu na 7. dan eksperimenta), # $p < 0,05$, ##### $p < 0,0001$ (u odnosu na 14. dan eksperimenta), §§§ $p < 0,001$; §§§§ $p < 0,0001$ (u odnosu na 21. dan eksperimenta). Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa ponovljenim merenjem i LSD post hoc testom. Dijagram predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), linija unutar okvira označava srednju vrednost, a minimalne i maksimalne vrednosti unutar grupe naglašene su krajnjim ivicama iznad dijagrama

4.3.2.2. Uticaj na prirast telesne mase

4.3.2.2.1. Sulforafan

Prirast telesne mase i procentualna razlika u odnosu na kontrolu, praćena je u četiri vremenska perioda i to, nakon 7, 14, 21. i 28. dana eksperimenta. Kod mužjaka pacova, prirast telesne mase bio je značajno niži u odnosu na kontrolu u grupi SFN 2 nakon 14. i 28. dana. Pored toga, nakon 28. dana uočeno je i smanjenje telesne mase veći od 10% u SFN 3 grupi (Tabela 24). Primena SFN imala je veći uticaj na prirast telesne mase ženki pacova. U grupama SFN 1 i SFN 2, zabeleženo je statistički značajno smanjenje telesne mase u sva četiri vremenska perioda, dok je u grupi koja je primala najvišu dozu SFN takođe, uočeno smanjenje mase, ali bez statističke značajnosti (Tabela 25). Prema

smernicama SZO štetnim efektom smatra se svaka promena u telesnoj masi koja je za više ili manje od 10% različita u odnosu na kontrolu (139).

Tabela 24. Uticaj rastućih doza sulforafana na prirast telesne mase kod mužjaka pacova tokom 28 dana oralne ekspozicije

	Kontrola	SFN 1	SFN 2	SFN 3
7. dan % u odnosu na kontrolu	0,21 ± 0,016 /	0,22 ± 0,015 5%	0,24 ± 0,086 14%	0,22 ± 0,023 5%
14. dan % u odnosu na kontrolu	0,34 ± 0,017 /	0,32 ± 0,011 -6%	0,21 ± 0,13 ** -38%	0,34 ± 0,032 0%
21. dan % u odnosu na kontrolu	0,4 ± 0,046 /	0,41 ± 0,013 2%	0,37 ± 0,03 -7,50%	0,41 ± 0,04 2%
28. dan % u odnosu na kontrolu	0,53 ± 0,039 /	0,49 ± 0,014 -7,50%	0,46 ± 0,064 * -13%	0,46 ± 0,043 * -13%

* p<0,05, ** p<0,01; Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, n = 5. SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m/dan); SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m/dan); SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m/dan)

Tabela 25. Uticaj rastućih doza sulforafana na prirast telesne mase kod ženki pacova tokom 28 dana oralne ekspozicije

	Kontrola	SFN 1	SFN 2	SFN 3
7. dan % u odnosu na kontrolu	0,21 ± 0,018 /	0,17 ± 0,056 * -19%	0,16 ± 0,011 * -24%	0,19 ± 0,022 -9,50%
14. dan % u odnosu na kontrolu	0,33 ± 0,038 /	0,26 ± 0,03 ** -21%	0,26 ± 0,022 ** -21%	0,31 ± 0,023 -6%
21. dan % u odnosu na kontrolu	0,39 ± 0,051 /	0,31 ± 0,021 * -20%	0,31 ± 0,016 * -20%	0,33 ± 0,079 -15%
28. dan % u odnosu na kontrolu	0,45 ± 0,049 /	0,37 ± 0,023 * -18%	0,38 ± 0,015 * -16%	0,41 ± 0,1 -9%

* p<0,05, ** p<0,01; Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, n = 5. SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m/dan); SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m/dan); SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m/dan)

4.3.2.2.2. Inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Na isti način ispitan je uticaj PA-MSHA na prirast telesne mase kod mužjaka i ženki pacova u četiri vremenska perioda. Kod mužjaka pacova, prirast telesne mase bio je značajno niži u odnosu na kontrolu samo nakon 28. dana u grupama PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 i to za 13%, odnosno 19%, redom (Tabela 26). Međutim, kod ženki pacova, smanjenje prirasta telesne mase bilo je izraženo u svim vremenskim periodima i u svim ispitivanim grupama (Tabela 27). Najveća razlika u PA-MSHA 1 grupi zabeležena je posle 7. dana, i postepeno se smanjivala, da bi 28. dana razlika između kontrolne i tretirane grupe bila 11%. Sličan trend zabeležen je i u PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 grupi, ali je u ovim grupama najveća razlika uočena nakon 14 dana tretmana.

Tabela 26. Uticaj rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na prirast telesne mase kod mužjaka pacova tokom 28 dana subkutane ekspozicije

	Kontrola	PA-MSHA 1	PA-MSHA 2	PA-MSHA 3
7. dan % u odnosu na kontrolu	0,21 ± 0,016 /	0,19 ± 0,022 -10%	0,24 ± 0,033 14%	0,21 ± 0,12 /
14. dan % u odnosu na kontrolu	0,34 ± 0,017 /	0,31 ± 0,036 -9%	0,34 ± 0,033 /	0,31 ± 0,1 -9%
21. dan % u odnosu na kontrolu	0,4 ± 0,046 /	0,4 ± 0,04 /	0,43 ± 0,044 7,50%	0,41 ± 0,084 2%
28. dan % u odnosu na kontrolu	0,53 ± 0,039 /	0,48 ± 0,026 -9,50%	0,46 ± 0,041 * -13%	0,43 ± 0,094 * -19%

* $p < 0,05$; Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, $n = 5$. PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,36 \times 10^9$ ćelija/ml)

Tabela 27. Uticaj rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na prirast telesne mase kod ženki pacova tokom 28 dana subkutane ekspozicije

	Kontrola	PA-MSHA 1	PA-MSHA 2	PA-MSHA 3
7. dan % u odnosu na kontrolu	0,21 ± 0,018 /	0,14 ± 0,089 * -34%	0,15 ± 0,013 * -29%	0,17 ± 0,012 -19%
14. dan % u odnosu na kontrolu	0,33 ± 0,038 /	0,26 ± 0,023 *** -21%	0,22 ± 0,016 **** -33%	0,24 ± 0,02 **** -27%
21. dan % u odnosu na kontrolu	0,39 ± 0,051 /	0,32 ± 0,014 * -18%	0,29 ± 0,032 *** -25%	0,3 ± 0,031 ** -23%
28. dan % u odnosu na kontrolu	0,45 ± 0,049 /	0,4 ± 0,016 * -11%	0,36 ± 0,033 *** -20%	0,36 ± 0,029 *** -20%

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, $n = 5$. PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,36 \times 10^9$ ćelija/ml)

4.3.2.2.3. Kombinovana primena imunomodulatora

Kombinovana primena SFN i PA-MSHA u 3 doze dovela je do promena prirasta telesne mase kod mužjaka i ženki pacova (Tabele 28 i 29). Rezultati pokazuju da je u grupi koja je tretirana najvišom dozom SFN i PA-MSHA (MIX 3) nakon 7. i 21. dana tretmana zabeležen porast telesne mase od 14% i 27%, redom, dok je prirast telesne mase u ostalim grupama bio sličan kontrolnoj grupi (Tabela 28). Suprotno tome, kod ženki pacova je zabeleženo smanjene telesne mase u grupi MIX 1 i MIX 2 u svim vremenskim periodima, dok je u grupi MIX 3 jedino statistički značajno smanjenje telesne mase uočeno 21. dana tretmana (Tabela 29).

Tabela 28. Uticaj kombinovane primene rastućih doza sulforafana i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na prirast telesne mase kod mužjaka pacova tokom 28 dana ekspozicije

	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3
7. dan % u odnosu na kontrolu	0,21 ± 0,016 /	0,2 ± 0,0099 -5%	0,21 ± 0,013 /	0,23 ± 0,014 * 14%
14. dan % u odnosu na kontrolu	0,34 ± 0,017 /	0,33 ± 0,017 -3%	0,32 ± 0,029 -6%	0,33 ± 0,017 -3%
21. dan % u odnosu na kontrolu	0,4 ± 0,046	0,42 ± 0,023 5%	0,42 ± 0,027 5%	0,51 ± 0,04 *** 27%
28. dan % u odnosu na kontrolu	0,53 ± 0,039 /	0,5 ± 0,029 -6%	0,49 ± 0,04 -7,50%	0,5 ± 0,017 -6%

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, $n = 5$. MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + $0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + $0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + $0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); SFN - sulforafan; PA-MSHA - inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Tabela 29. Uticaj kombinovane primene rastućih doza sulforafana i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na prirast telesne mase kod ženki pacova tokom 28 dana ekspozicije

	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3
7. dan % u odnosu na kontrolu	0,21 ± 0,018 /	0,15 ± 0,019 * -29%	0,15 ± 0,0088 * -29%	0,18 ± 0,091 -14%
14. dan % u odnosu na kontrolu	0,33 ± 0,038 /	0,22 ± 0,027 ** -33%	0,23 ± 0,021 * -30%	0,27 ± 0,1 -18%
21. dan % u odnosu na kontrolu	0,39 ± 0,051 /	0,26 ± 0,041 ** -33%	0,27 ± 0,015 ** -31%	0,3 ± 0,091 * -23%
28. dan % u odnosu na kontrolu	0,45 ± 0,049 /	0,33 ± 0,043 ** -27%	0,37 ± 0,02 * -18%	0,41 ± 0,1 -9%

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, $n = 5$. MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + $0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + $0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + $0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); SFN - sulforafan; PA-MSHA - inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

4.3.2.3. Uticaj na relativnu masu organa

4.3.2.3.1. Sulforafan

Uticaj primene SFN na promenu relativne mase organa kod mužjaka i ženki pacova u odnosu na kontrolu nakon 28 dana ekspozicije predstavljen je u Tabelama 30 i 31. Kod mužjaka pacova je dobijeno statistički značajno smanjenje relativne mase bubrega pacova u grupama SFN 1 i SFN 3, kao i smanjenje relativne mase jetre i prostate u grupama SFN 3 i SFN 1, redom. Pored toga, iako razlika nije bila statistički značajna, zabeležen je blagi porast relativne mase pluća u svim tretiranim grupama. Kod ženki pacova SFN tretman je doveo do porasta relativne mase pluća, samo u SFN 1 grupi (kontrola vs. tretman: $0,004857 \pm 0,00102$ vs. $0,00596 \pm 0,00054$).

Tabela 30. Uticaj rastućih doza sulforafana na relativnu masu organa kod mužjaka pacova nakon 28 dana oralne ekspozicije

Organ	Kontrola	SFN 1	SFN 2	SFN 3
Bubrezi	0,00627 ± 0,000515	0,00562 ± 0,00045 *	0,00608 ± 0,000267	0,00566 ± 0,00048 *
Jetra	0,03565 ± 0,003834	0,03459 ± 0,002241	0,03508 ± 0,003358	0,03093 ± 0,00169 *
Mozak	0,004479 ± 0,00042	0,004475 ± 0,00031	0,004516 ± 0,000501	0,004257 ± 0,000236
Pluća	0,003932 ± 0,000637	0,004234 ± 0,00041	0,004745 ± 0,00055	0,004546 ± 0,000911
Prostata	0,001297 ± 0,000324	0,0017 ± 0,000301 *	0,001432 ± 0,0002	0,001506 ± 0,00033
Slezina	0,001992 ± 0,000178	0,00185 ± 0,000250	0,001968 ± 0,00025	0,00182 ± 0,000351
Srce	0,002808 ± 0,00023	0,002803 ± 0,000103	0,002785 ± 0,000252	0,00261 ± 0,00025
Testisi	0,006651 ± 0,002631	0,007754 ± 0,0002	0,007854 ± 0,00064	0,006724 ± 0,000379
Timus	0,001908 ± 0,00049	0,00161 ± 0,00039	0,001824 ± 0,00039	0,001692 ± 0,00025

* $p < 0,05$; Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, $n = 5$. SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m./dan); SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m./dan); SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m./dan)

Tabela 31. Uticaj rastućih doza sulforafana na relativnu masu organa kod ženki pacova nakon 28 dana oralne ekspozicije

Organ	Kontrola	SFN 1	SFN 2	SFN 3
Bubrezi	0,005734 ± 0,00044	0,00565 ± 0,000337	0,00582 ± 0,000332	0,00607 ± 0,000789
Jetra	0,03675 ± 0,003881	0,03665 ± 0,00245	0,03758 ± 0,002047	0,03735 ± 0,004175
Mozak	0,005313 ± 0,000221	0,005518 ± 0,00015	0,005392 ± 7,47E-05	0,005488 ± 0,00087
Pluća	0,004857 ± 0,00102	0,00596 ± 0,00054 *	0,004995 ± 0,000381	0,005401 ± 0,000813
Slezina	0,00197 ± 0,000233	0,002217 ± 0,00011	0,00218 ± 0,00034	0,002305 ± 0,00033
Srce	0,002788 ± 0,00022	0,00285 ± 0,00011	0,002942 ± 0,00023	0,00306 ± 0,000398
Timus	0,002389 ± 0,00055	0,002347 ± 0,00066	0,002197 ± 0,00043	0,00247 ± 0,00085

* $p < 0,05$; Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, $n = 5$. SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m./dan); SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m./dan); SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m./dan)

4.3.2.3.2. Inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Uticaj primene PA-MSHA na promenu relativne mase organa praćen je kod mužjaka i ženki pacova i poreden sa kontrolom nakon 28 dana subkutane ekspozicije. Dobijeni rezultati predstavljeni su tabelarno (Tabele 32 i 33). Kao i u grupama tretiranim SFN, značajna promena relativne mase organa uočena je kod mužjaka pacova. Relativna masa pluća i srca tretiranih mužjaka rasla je sa porastom primenjene doze PA-MSHA, dok je masa jetre bila statistički značajno manja u odnosu na kontrolu nakon 28. dana tretmana u grupama PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3. Dodatno, zabeleženo je smanjenje relativne mase timusa, ali samo u grupi 1, odnosno kod mužjaka pacova tretiranih najnižom dozom PA-MSHA ($0,9 \times 10^9$ ćelije/ml). Kod ženki pacova uočeno je dozno-zavisni porast relativne mase srca, pri čemu je jedino statistički značajno povećanje u odnosu na kontrolu bilo u

grupi 2 ($p < 0,01$). S druge strane, relativna masa jetre tretiranih ženki u PA-MSHA 3 grupi bila je značajno niža u odnosu na kontrolu.

Tabela 32. Uticaj rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na relativnu masu organa kod mužjaka pacova nakon 28 dana subkutane ekspozicije

Organ	Kontrola	PA-MSHA 1	PA-MSHA 2	PA-MSHA 3
Bubrezi	0,00627 ± 0,000515	0,005991 ± 0,000276	0,006284 ± 0,000462	0,00586 ± 0,000377
Jetra	0,03565 ± 0,003834	0,03648 ± 0,002336	0,0284 ± 0,0023 ***	0,027 ± 0,0008 ****
Mozak	0,004479 ± 0,00042	0,004096 ± 0,00031	0,004329 ± 0,000355	0,004713 ± 0,000299
Pluća	0,003932 ± 0,000637	0,0049 ± 0,00042 **	0,00512 ± 0,0007 **	0,006 ± 0,0004 ****
Prostata	0,001297 ± 0,000324	0,001269 ± 0,00025	0,00133 ± 0,000164	0,00136 ± 0,0003742
Slezina	0,001992 ± 0,000178	0,001864 ± 0,000276	0,002056 ± 0,000411	0,001882 ± 0,00034
Srce	0,002808 ± 0,00023	0,00276 ± 0,000234	0,00341 ± 0,0004 **	0,00342 ± 0,0005 **
Testisi	0,006651 ± 0,002631	0,006853 ± 0,0057	0,007183 ± 0,000449	0,007655 ± 0,000325
Timus	0,001908 ± 0,00049	0,0012 ± 0,000489 *	0,001798 ± 0,000175	0,00193 ± 0,00046

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, $n = 5$. PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,36 \times 10^9$ ćelija/ml)

Tabela 33. Uticaj rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na relativnu masu organa kod ženki pacova nakon 28 dana subkutane ekspozicije

Organ	Kontrola	PA-MSHA 1	PA-MSHA 2	PA-MSHA 3
Bubrezi	0,005734 ± 0,00044	0,00598 ± 0,000585	0,005662 ± 0,000449	0,00572 ± 0,000521
Jetra	0,03675 ± 0,003881	0,03822 ± 0,003771	0,03373 ± 0,00264	0,0317 ± 0,00323 *
Mozak	0,005313 ± 0,000221	0,005481 ± 0,000545	0,005397 ± 0,000384	0,005154 ± 9,74E-05
Pluća	0,004857 ± 0,00102	0,005891 ± 0,00059	0,005637 ± 0,000843	0,005579 ± 0,00124
Slezina	0,00197 ± 0,000233	0,002059 ± 0,000344	0,002142 ± 0,00023	0,00216 ± 0,000471
Srce	0,002788 ± 0,00022	0,00296 ± 8,63E-05	0,0034 ± 0,00034 **	0,00312 ± 0,000410
Timus	0,002389 ± 0,00055	0,002392 ± 0,00088	0,00224 ± 0,00052	0,002174 ± 0,00044

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, $n = 5$. PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,36 \times 10^9$ ćelija/ml)

4.3.2.3.3. Kombinovana primena imunomodulatora

Rezultati uticaja kombinovane primene SFN i PA-MSHA na promenu relativne mase organa tretiranih pacova u odnosu na kontrolu prikazani su tabelarno, kao srednja vrednost i standardna devijacija (Tabela 34 i Tabela 35). Interesantno, primenjena kombinacija nije dovela do značajnih promena ni kod mužjaka ni kod ženki pacova. Jedina statistički značajna razlika kod mužjaka uočena je na nivou pluća gde je tretman doveo do dozno-

zavisnog povećanja relativne mase posmatranog organa. Kod ženki pacova došlo je do blagog uvećanja slezine, pri čemu je jedino statistički značajno uvećanje u odnosu na kontrolu primećeno u grupi 1 (MIX 1).

Tabela 34. Uticaj kombinovane primene rastućih doza sulforafana i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na relativnu masu organa kod mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije

Organ	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3
Bubrezi	0,00627 ± 0,000515	0,00604 ± 0,000311	0,005925 ± 0,00045	0,00606 ± 0,000557
Jetra	0,03565 ± 0,003834	0,03659 ± 0,003105	0,03459 ± 0,002561	0,03614 ± 0,00301
Mozak	0,004479 ± 0,00042	0,004385 ± 0,000171	0,004209 ± 0,00031	0,00427 ± 0,0002
Pluća	0,003932 ± 0,000637	0,004465 ± 0,000183	0,00481 ± 0,00027 *	0,0051 ± 0,00076 **
Prostata	0,001297 ± 0,000324	0,001202 ± 0,000525	0,00121 ± 0,000112	0,00166 ± 0,000353
Slezina	0,001992 ± 0,000178	0,001867 ± 0,00011	0,001822 ± 0,000267	0,002017 ± 0,000222
Srce	0,002808 ± 0,00023	0,00298 ± 0,000198	0,00263 ± 0,000163	0,002719 ± 0,000161
Testisi	0,006651 ± 0,002631	0,007188 ± 0,00074	0,00685 ± 0,000699	0,007642 ± 0,0012
Timus	0,001908 ± 0,00049	0,001792 ± 0,00056	0,001688 ± 0,00069	0,00122 ± 0,00053

* $p < 0,05$; Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, $n = 5$. MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + $0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + $0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + $0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); SFN - sulforafan; PA-MSHA - inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Tabela 35. Uticaj kombinovane primene rastućih doza sulforafana i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na relativnu masu organa kod ženki pacova nakon 28 dana ekspozicije

Organ	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3
Bubrezi	0,005734 ± 0,00044	0,005726 ± 0,000424	0,005489 ± 0,000292	0,005933 ± 0,00028
Jetra	0,03675 ± 0,003881	0,03694 ± 0,002105	0,03587 ± 0,002696	0,03736 ± 0,002926
Mozak	0,005313 ± 0,000221	0,005385 ± 0,00042	0,005209 ± 3,37E-05	0,005202 ± 0,00063
Pluća	0,004857 ± 0,00102	0,005635 ± 0,000585	0,005628 ± 0,00106	0,005531 ± 0,000862
Slezina	0,00197 ± 0,000233	0,00236 ± 0,00025 *	0,002263 ± 6,22E-05	0,002109 ± 0,00031
Srce	0,002788 ± 0,00022	0,002864 ± 0,00044	0,002851 ± 0,00019	0,00298 ± 0,000418
Timus	0,002389 ± 0,00055	0,002004 ± 0,00068	0,002196 ± 0,0004	0,002292 ± 0,00077

* $p < 0,05$; Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, $n = 5$. MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + $0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + $0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + $0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); SFN - sulforafan; PA-MSHA - inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

4.3.2.4. Uticaj na hematološke parametre

4.3.2.4.1. Sulforafan

Hematološki parametri izmereni u krvi mužjaka pacova nakon tretmana rastućim dozama SFN tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 36. Kod pacova koji su primali najvišu dozu SFN (SFN 3) dobijen je statistički značajan porast procenta limfocita (%) u krvi u poređenju sa kontrolom. U SFN 3 grupi uočava se smanjenje % neutrofila, a porast broja limfocita. Pored toga, uočena je razlika između SFN 2 i SFN 3 grupe u broju leukocita i limfocita pri čemu je u krvi mužjaka pacova u SFN 3 grupi izmeren značajno viši broj u odnosu na SFN 2 grupu ($p < 0,05$). Dalje, između kontrole i SFN 2 grupe postajala je razlika u % bazofila koji su kod tretiranih pacova bili sniženi u odnosu na kontrolu.

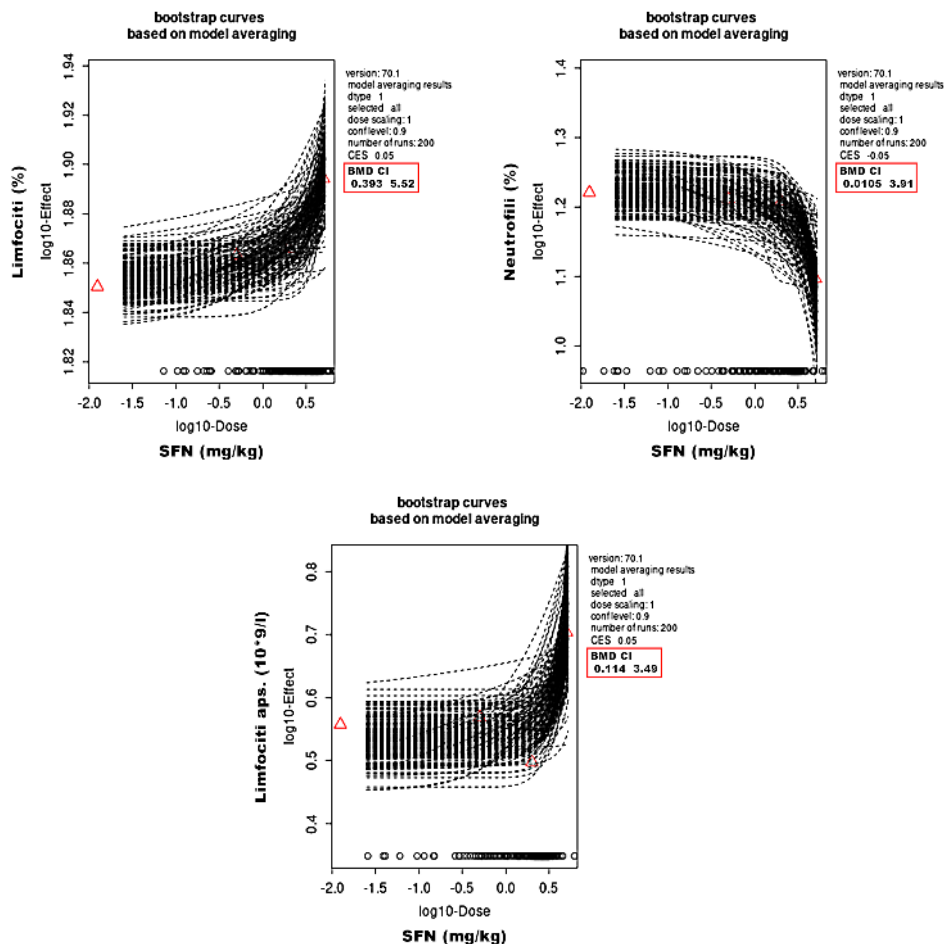
Tabela 36. Uticaj rastućih doza sulforafana na hematološke parametre mužjaka pacova nakon 28 dana oralne ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	SFN 1	SFN 2	SFN 3
Leukociti (10 ⁹ /l)	5,367 ± 2,028	5,2 ± 1,183	4,4 ± 1,125	6,52 ± 1,05 ⁺
Limfociti (%)	71,03 ± 5,487	73 ± 1,897	73,58 ± 4,934	78,5 ± 4,444 *
Monociti (%)	9,05 ± 2,723	8,42 ± 1,689	7,72 ± 3,611	6,52 ± 1,41
Neutrofili (%)	16,97 ± 3,682	16,3 ± 1,151	16,54 ± 4,182	12,86 ± 3,483
Eozinofili (%)	0,15 ± 0,08367	0,36 ± 0,4722	0,16 ± 0,08944	0,1 ± 0
Bazofili (%)	2,8 ± 0,5899	1,92 ± 0,507	2 ± 0,6745 *	2,02 ± 0,8289
Limfociti aps. (10 ⁹ /l)	3,8 ± 1,403	3,8 ± 0,8994	3,234 ± 0,8217	5,136 ± 0,9648 ⁺
Monociti aps. (10 ⁹ /l)	0,5083 ± 0,3067	0,442 ± 0,139	0,318 ± 0,1117	0,422 ± 0,1043
Neutrofili aps. (10 ⁹ /l)	0,9 ± 0,3396	0,84 ± 0,1544	0,754 ± 0,3554	0,826 ± 0,2027
Eozinofili aps. (10 ⁹ /l)	0,0083 ± 0,00983	0,018 ± 0,0295	0,01 ± 0,007071	0,01 ± 0
Bazofili aps. (10 ⁹ /l)	0,1505 ± 0,06348	0,0962 ± 0,0203	0,0894 ± 0,045	0,1288 ± 0,04593
Eritrociti (10 ¹² /l)	7,032 ± 0,5935	7,49 ± 0,9259	7,202 ± 0,6006	7,448 ± 0,5531
Hemoglobin (g/l)	136,2 ± 15,05	144,4 ± 19,88	138 ± 9,354	144,4 ± 10,64
Hematokrit (l/l)	0,391 ± 0,05146	0,4138 ± 0,0608	0,3946 ± 0,0355	0,4088 ± 0,03706
MCV (fl)	55,45 ± 2,665	55,16 ± 1,838	54,76 ± 1,27	54,84 ± 2,352
MCH (pg)	19,37 ± 0,5538	19,24 ± 0,503	19,18 ± 0,3033	19,38 ± 0,614
MCHC (g/l)	348,8 ± 7,6	349,6 ± 7,127	350,4 ± 10,06	353,6 ± 9,711
Trombociti (10 ⁹ /l)	358,5 ± 74,82	387,6 ± 18,08	441,6 ± 117,3	399 ± 32,96

* $p < 0,05$ (u poređenju sa kontrolom); ⁺ $p < 0,05$ (u poređenju sa SFN 2 grupom); Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije. SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m/dan); SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m/dan); SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m/dan); MCV: srednji korpuskularni volumen, MCH: srednji korpuskularni hemioglobin, MCHC: srednja korpuskularna koncentracija hemioglobina

BMD analizom ispitana je zavisnost promene nivoa hematoloških parametara u krvi pacova od doze ispitivane supstance. Dobijeni grafici (broj iteracija: 200) zasnovani su na uprosečavanju modela i prikazani na Slici 30 gde su rezultati izraženi kao interval, odnosno gornja i donja granica pouzdanosti od 95% BMDU i BMDL, redom. Ushodni trend krive primećen je u slučaju uticaja SFN na % i broj ukupnih limfocita u krvi mužjaka

pacova, a nishodan u slučaju procene uticaja SFN na % neutrofila. BMDL koji može dovesti do 5% povećanja % limfocita u krvi pacova iznosio je 0,393 mg/kg t.m./dan SFN, dok je BMDL za ukupan broj limfocita 0,114 mg/kg t.m./dan. Konačno, izračunata donja granica pouzdanosti koja može dovesti do 5% smanjenja % neutrofila u krvi mužjaka pacova iznosi 0,0105 mg/kg t.m./dan (140) (Slika 30).



Slika 30. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih doza sulforafana i hematoloških parametara kod mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije
SFN (0,5, 2 i 5 mg/kg t.m./dan); Broj iteracija: 200. SFN: sulforafan

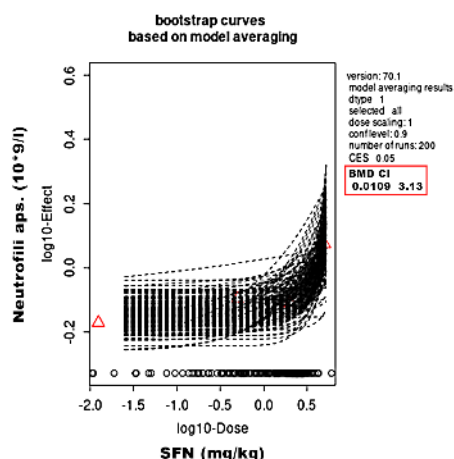
Hematološki parametri izmereni su i u krvi ženki pacova nakon tretmana rastućim dozama SFN tokom 28 dana. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 37. Jedino statistički značajno povećanje primećeno je u SFN 3 grupi u odnosu na kontrolu, i to u broju apsolutnih neutrofila. Poređenjem svih grupa međusobno, uočeno je smanjenje MCHC parametra u grupi SFN 1 u odnosu na grupu SFN 2 ($p < 0,05$).

Tabela 37. Uticaj rastućih doza sulforafana na hematološke parametre ženki pacova nakon 28 dana oralne ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	SFN 1	SFN 2	SFN 3
Leukociti (10*9/l)	4,25 ± 1,205	4,64 ± 0,5595	3,84 ± 1,189	6,04 ± 3,028
Limfociti (%)	71,97 ± 5,815	72,18 ± 3,451	67 ± 2,909	64,04 ± 12,05
Monociti (%)	9,2 ± 3,976	7,6 ± 0,8573	9,18 ± 1,182	10,92 ± 4,303
Neutrofili (%)	16,72 ± 3,195	17,62 ± 3,333	21,06 ± 2,751	22,82 ± 8,666
Eozinofili (%)	0,3 ± 0,3464	0,44 ± 0,4879	0,28 ± 0,1483	0,24 ± 0,1673
Bazofili (%)	1,817 ± 0,7548	2,16 ± 0,6731	2,48 ± 0,4658	1,98 ± 0,4868
Limfociti aps. (10*9/l)	3,105 ± 1,055	3,36 ± 0,5349	2,594 ± 0,9	3,65 ± 1,286
Monociti aps. (10*9/l)	0,37 ± 0,1231	0,356 ± 0,07021	0,358 ± 0,1439	0,756 ± 0,7073
Neutrofili aps. (10*9/l)	0,685 ± 0,1198	0,806 ± 0,09555	0,784 ± 0,1258	1,5 ± 0,1313 *
Eozinofili aps. (10*9/l)	0,01333 ± 0,0136	0,018 ± 0,01789	0,01 ± 0,007071	0,012 ± 0,004472
Bazofili aps. (10*9/l)	0,078 ± 0,03986	0,1014 ± 0,03584	0,0946 ± 0,031	0,1232 ± 0,06675
Eritrociti (10*12/l)	7,115 ± 0,8097	7,036 ± 0,7282	6,94 ± 0,7503	6,49 ± 0,4684
Hemoglobin (g/l)	138,7 ± 14,25	137,6 ± 14,88	138,4 ± 17,01	128,6 ± 7,797
Hematokrit (l/l)	0,3962 ± 0,04826	0,3956 ± 0,05132	0,384 ± 0,05071	0,3588 ± 0,02525
MCV (fl)	55,65 ± 1,758	56,12 ± 1,678	55,22 ± 1,997	55,32 ± 1,966
MCH (pg)	19,52 ± 0,5037	19,56 ± 0,5595	19,9 ± 0,5831	19,82 ± 0,687
MCHC (g/l)	350,8 ± 7,859	348,4 ± 9,099 +	360,6 ± 3,912	358,6 ± 10,74
Trombociti (10*9/l)	451 ± 137,6	405,4 ± 104	409,2 ± 155,5	412,8 ± 102,8

*p<0,05 (u poređenju sa kontrolom); + p<0,05 (u poređenju sa SFN 2 grupom); Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije. SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m/dan); SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m/dan); SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m/dan); MCV: srednji korpuskularni volumen, MCH: srednji korpuskularni hemoglobin, MCHC: srednja korpuskularna koncentracija hemoglobina

Da bi se dalje istražio uticaj SFN na hematološke parametre kod ženki pacova, a u smislu odnosa doza-odgovor, sprovedena je BMD analiza istim postupkom kako što je prethodno objašnjeno. Od svih praćenih hematoloških parametara dozna zavisnost pokazana je samo za apsolutni broj neutrofila kod ženki pacova. Dobijen grafik prikazan je na Slici 31 pri čemu je rezultat izražen kao interval. Ushodni trend krive ukazuje na potencijal SFN da dovede po 5% povećanja apsolutnog broja neutrofila u krvi ženki pacova kada se primenjuje u dozi od 0,0109 mg/kg t.m./dan (Slika 31).



Slika 31. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih doza sulforafana i hematološkog parametra apsolutnog broja neutrofila kod ženki pacova nakon 28 dana ekspozicije SFN (0,5, 2 i 5 mg/kg t.m/dan); Broj iteracija: 200. SFN: sulforafan

4.3.2.4.2. Inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Dobijeni rezultati za hematološke parametre izmerene u krvi mužjaka pacova nakon tretmana rastućim dozama PA-MSHA prikazani su u Tabeli 38. U grupama tretiranim PA-MSHA uočene su značajnije promene hematoloških parametara u odnosu na SFN. U odnosu na kontrolu statistički značajan porast broja leukocita uočen je u grupi PA-MSHA 1 ($p < 0,05$), dok je u odnosu na grupu PA-MSHA 1 dobijeno smanjenje broja leukocita u grupama PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 ($p < 0,05$). Dalje, u odnosu na kontrolu, procenat monocita, broj eritrocita i nivo hematokrita bio je značajno niži u grupama tretiranim PA-MSHA. U slučaju eritrocita i hematokrita, efekat je bio dozno-zavistan. S druge strane, procenat eozinofila, MCHC i broj trombocita značajno je viši u tretiranim grupama u odnosu na kontrolu. Dozno-zavisna veza uočena je kod MCHC parametra i broja trombocita. Poređenjem svih grupa međusobno, uočeno je smanjenje broja leukocita u grupama PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 u odnosu na grupu PA-MSHA 1 ($p < 0,05$). Takođe, statistički značajno smanjenje broja apsolutnih limfocita, monocita i bazofila u odnosu na PA-MSHA 1 grupu, uočeno je u grupama PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3, odnosno PA-MSHA 2 (u slučaju bazofila). Procentualni rast neutrofila dobijen je u grupama PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 u odnosu na PA-MSHA 1 ($p < 0,05$), kao i eozinofila u grupi PA-MSHA 2 ($p < 0,01$). Statistički značajna razlika između PA-MSHA 1 i PA-MSHA 3 dobijena je i u slučaju koncentracije MCHC, dok je broj trombocita bio viši sa povećanjem primenjene koncentracije PA-MSHA, odnosno u grupama PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 u odnosu na grupu PA-MSHA ($p < 0,01$).

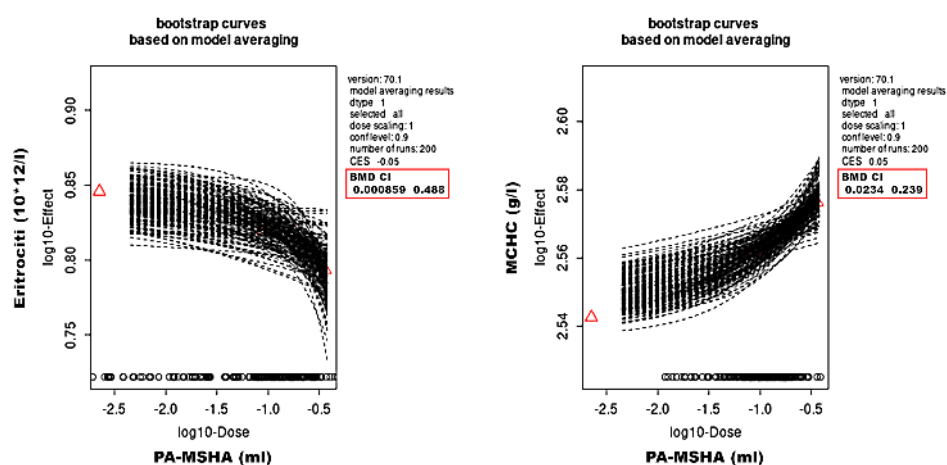
Tabela 38. Uticaj rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na hematološke parametre u krvi mužjaka pacova nakon 28 dana subkutane ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	PA-MSHA 1	PA-MSHA 2	PA-MSHA 3
Leukociti ($10^9/l$)	$5,367 \pm 2,028$	$7,92 \pm 1,914^*$	$4,6 \pm 2,104^+$	$4,46 \pm 0,7232^+$
Limfociti (%)	$71,03 \pm 5,487$	$69,42 \pm 10,33$	$70,26 \pm 4,266$	$68,68 \pm 4,461$
Monociti (%)	$9,05 \pm 2,723$	$12,9 \pm 10,2$	$5,86 \pm 1,89^*$	$6,24 \pm 2,066^*$
Neutrofili (%)	$16,97 \pm 3,682$	$14,96 \pm 2,698$	$21,08 \pm 5,77^+$	$22,04 \pm 4,611^+$
Eozinofili (%)	$0,15 \pm 0,08367$	$0,2 \pm 0,07071$	$0,4 \pm 0,122^{***++}$	$0,32 \pm 0,1304^*$

Bazofili (%)	2,8 ± 0,5899	2,52 ± 0,5891	2,4 ± 0,7583	2,72 ± 0,7294
Limfociti aps. (10*9/l)	3,8 ± 1,403	5,508 ± 1,707	3,23 ± 1,494 ⁺	3,076 ± 0,6187 ⁺
Monociti aps. (10*9/l)	0,5083 ± 0,3067	1,054 ± 0,9608	0,296 ± 0,2094 ⁺	0,286 ± 0,1159 ⁺
Neutrofili aps. (10*9/l)	0,9 ± 0,3396	1,15 ± 0,1251	0,942 ± 0,4765	0,962 ± 0,1236
Eozinofili aps. (10*9/l)	0,00833 ± 0,0098	0,016 ± 0,005477	0,02 ± 0,01225	0,014 ± 0,008944
Bazofili aps. (10*9/l)	0,1505 ± 0,06348	0,1934 ± 0,03602	0,114 ± 0,06217 ⁺	0,1238 ± 0,04307
Eritrociti (10*12/l)	7,032 ± 0,5935	6,61 ± 0,5075	6,6 ± 0,3007	6,236 ± 0,5641 *
Hemoglobin (g/l)	136,2 ± 15,05	130 ± 7,314	133,4 ± 3,647	125,8 ± 10,59
Hematokrit (l/l)	0,391 ± 0,05146	0,3564 ± 0,01595	0,3596 ± 0,01785	0,334 ± 0,02939 *
MCV (fl)	55,45 ± 2,665	54,08 ± 3,562	54,58 ± 2,976	53,58 ± 0,6301
MCH (pg)	19,37 ± 0,5538	19,72 ± 1,341	20,24 ± 0,5595	20,18 ± 0,2588
MCHC (g/l)	348,8 ± 7,6	364,4 ± 6,229 **	371,4 ± 13,24 ***	377 ± 3,08 **** ⁺
Trombociti (10*9/l)	358,5 ± 74,82	384 ± 49,49	483,2 ± 19,1 ** ⁺⁺	490 ± 20,15 ** ⁺⁺

*p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001 (u poređenju sa kontrolom); + p<0,05; ++ p<0,01 (u poređenju sa PA-MSHA 1 grupom); Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije. PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,09 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,18 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,36 x 10⁹ ćelija/ml); MCV: srednji korpuskularni volumen, MCH: srednji korpuskularni hemoglobin, MCHC: srednja korpuskularna koncentracija hemoglobina

Za dalje ispitivanje uticaja PA-MSHA na hematološke parametre kod mužjaka pacova i procene odnosa primenjena doza-odgovor, sprovedena je BMD analiza pri čemu su korišćeni isti parametri kao što je prethodno navedeno. Dobijeni grafici (broj iteracija: 200) zasnovani su na fitovanju najboljeg modela i prikazani na Slici 32, a rezultati su izraženi kao interval između gornje i donje granice pouzdanosti. Ushodni trend krive primećen je u slučaju uticaja PA-MSHA na % eozinofila u krvi pacova i broja trombocita, dok je nishodan trend zabeležen u slučaju koncentracije hematokrita. Međutim, analizom odnosa BDMU/BMDL utvrđeno je da samo koncentracija MCHC i može zavisiti od primenjene doze PA-MSHA, dok kod ostalih parametara ovaj efekat nije potvrđen (Slika 32).



Slika 32. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i hematoloških parametara kod mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije

PA-MSHA (0,09 x 10⁹ ćelija/ml; 0,18 x 10⁹ ćelija/ml; 0,36 x 10⁹ ćelija/ml); Broj iteracija: 200. PA-MSHA: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Uticaj PA-MSHA na hematološke parametre u krvi ženki pacova detaljno su prikazani u Tabeli 39. Porast broja leukocita i limfocita dobijen je u grupi 2 (PA-MSHA 2) u odnosu na kontrolu, dok je procentualni porast eozinofila uočen u grupi PA-MSHA 1. Dalje, statistički značajan porast broja neutrofila i MCHC koncentracije uočen je u sve 3 tretirane grupe pacova. MCH parametar bio je nešto viši u grupi 2 u odnosu na kontrolu, a niži u PA-MSHA 3 grupi u odnosu na PA-MSHA 2. Koncentracija hematokrita smanjivala sa sa porastom primenjene doze PA-MSHA (u odnosu na kontrolu), dok je smanjenje broja eritrocita uočeno u grupama PA-MSHA 1 i PA-MSHA 2. Na kraju, koncentracija hematokrita bila je statistički značajno niža u PA-MSHA 1 u odnosu na kontrolu (p<0,05). U odnosu na grupu PA-MSHA 1, uočen je i procentualni porast limfocita u grupi PA-MSHA 2 kao i smanjenje u % i broju eozinofila u grupi PA-MSHA 3 (Tabela 39).

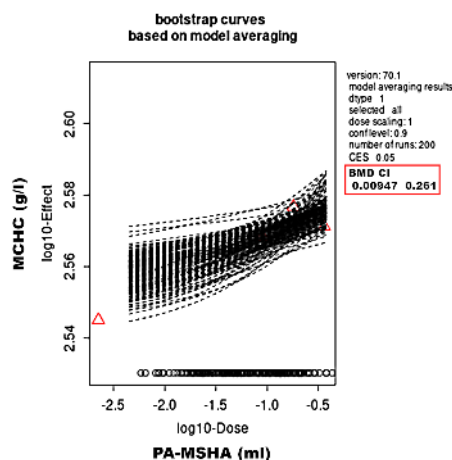
Tabela 39. Uticaj rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na hematološke parametre u krvi ženki pacova nakon 28 dana subkutane ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	PA-MSHA 1	PA-MSHA 2	PA-MSHA 3
Leukociti (10 ⁹ /l)	4,25 ± 1,205	5,2 ± 1,654	5,82 ± 0,9628 *	5,34 ± 0,9236
Limfociti (%)	71,97 ± 5,815	67,02 ± 5,77	74,24 ± 4,491 +	69,78 ± 2,345
Monociti (%)	9,2 ± 3,976	7 ± 2,473	5,1 ± 2,348 *	5,24 ± 2,253 *
Neutrofili (%)	16,72 ± 3,195	22,8 ± 2,641 **	18,5 ± 2,857	22,3 ± 4,26 *
Eozinofili (%)	0,3 ± 0,3464	1 ± 0,6042 *	0,62 ± 0,7791	0,28 ± 0,1095 +
Bazofili (%)	1,817 ± 0,7548	2,18 ± 1,073	1,54 ± 0,6107	2,4 ± 0,6442
Limfociti aps. (10 ⁹ /l)	3,105 ± 1,055	3,482 ± 1,083	4,328 ± 0,8566 *	3,718 ± 0,5971
Monociti aps. (10 ⁹ /l)	0,37 ± 0,1231	0,366 ± 0,1892	0,302 ± 0,1575	0,274 ± 0,1152
Neutrofili aps. (10 ⁹ /l)	0,685 ± 0,1198	1,184 ± 0,4055 *	1,062 ± 0,1339 *	1,208 ± 0,3937 **
Eozinofili aps. (10 ⁹ /l)	0,01333 ± 0,0136	0,052 ± 0,03493 *	0,034 ± 0,04336	0,014 ± 0,00894 +
Bazofili aps. (10 ⁹ /l)	0,078 ± 0,03986	0,117 ± 0,08459	0,0918 ± 0,04103	0,125 ± 0,02353
Eritrociti (10 ¹² /l)	7,115 ± 0,8097	6,004 ± 0,2648 **	6,292 ± 0,4928 *	6,406 ± 0,5035
Hemoglobin (g/l)	138,7 ± 14,25	121,2 ± 3,564 *	130,8 ± 9,23	12,2 ± 9,257
Hematokrit (l/l)	0,3962 ± 0,04826	0,3276 ± 0,015 **	0,3468 ± 0,0254 *	0,3438 ± 0,0203 *
MCV (fl)	55,65 ± 1,758	54,62 ± 2,925	55,18 ± 1,276	53,76 ± 1,962
MCH (pg)	19,52 ± 0,5037	20,2 ± 0,6892	20,82 ± 0,4438 **	20,04 ± 0,6504 #
MCHC (g/l)	350,8 ± 7,859	370,2 ± 9,149 ***	377,4 ± 8,62 ****	372,6 ± 5,639 ***
Trombociti (10 ⁹ /l)	451 ± 137,6	481,8 ± 56,92	519,6 ± 33,69	507,8 ± 51,02

*p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001 (u poređenju sa kontrolom); + p<0,05; ++ p<0,01 (u poređenju sa PA-MSHA 1 grupom); # p<0,05 (u odnosu na PA-MSHA 2); Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije. PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,09 x 10⁹ ćelije/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,18 x 10⁹ ćelije/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,36 x 10⁹ ćelije/ml); MCV: srednji korpuskularni volumen, MCH: srednji korpuskularni hemioglobin, MCHC: srednja korpuskularna koncentracija hemioglobina

Uticaj doze PA-MSHA na hematološke parametre kod ženki pacova ispitivan je *Benchmark* analizom i dobijeni grafik zasnovan na uprosečavanju modela prikazan je na

Slici 33, a rezultati su izraženi kao interval između gornje i donje granice pouzdanosti. Dobijena krive pokazuje da koncentracija MCHC u krvi ženki pacova raste sa porastom primenjene doze PA-MSHA (Slika 33).



Slika 33. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i hematološkog parametra MCHC kod ženki pacova nakon 28 dana ekspozicije PA-MSHA ($0,09 \times 10^9$ ćelije/ml; $0,18 \times 10^9$ ćelije/ml; $0,36 \times 10^9$ ćelije/ml); Broj iteracija: 200. PA-MSHA: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

4.3.2.4.3. Kombinovana primena imunomodulatora

Uticaj kombinovane primene SFN i PA-MSHA na hematološke parametre u krvi mužjaka pacova prikazan je u Tabeli 40. Statistički značajan procentualni porast limfocita i eozinofila, kao i smanjenje neutrofila i bazofila dobijeno je samo u MIX 1 grupi u odnosu na kontrolu. Pored toga, pacovi tretirani najvišom dozom SFN i PA-MSHA (MIX 3) pokazuju značajno povećanje koncentracije MCHC nakon 28 dana tretmana, u odnosu na kontrolu. Poređenjem svih grupa međusobno, uočeno je procentualno smanjenje eozinofila u MIX 3 grupi u odnosu na MIX 1, kao i apsolutnog broja eritrocita ($p < 0,05$). Koncentracija hemoglobina i hematokrita takođe je bila niža, a MCHC viša u MIX 3 grupi u odnosu na MIX 1 (Tabela 40).

Tabela 40. Uticaj kombinovane primene rastućih doza sulforafana i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na hematološke parametre u krvi mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3
Leukociti (10 ⁹ /l)	5,367 ± 2,028	6,64 ± 0,7635	6,14 ± 0,503	5,78 ± 2,058
Limfociti (%)	71,03 ± 5,487	77,94 ± 1,447 **	75,3 ± 3,619	75 ± 3,066
Monociti (%)	9,05 ± 2,723	7,82 ± 1,672	7,84 ± 1,383	8,02 ± 0,7918
Neutrofili (%)	16,97 ± 3,682	11,78 ± 1,895 *	14,3 ± 3,308	14,42 ± 2,699
Eozinofili (%)	0,15 ± 0,08367	0,4 ± 0,3391 *	0,18 ± 0,08367	0,14 ± 0,08944 +
Bazofili (%)	2,8 ± 0,5899	2,06 ± 0,5857 *	2,38 ± 0,3564	2,42 ± 0,3633
Limfociti aps. (10 ⁹ /l)	3,8 ± 1,403	5,178 ± 0,6191	4,638 ± 0,5720	4,352 ± 1,582
Monociti aps. (10 ⁹ /l)	0,5083 ± 0,3067	0,52 ± 0,1229	0,48 ± 0,06364	0,466 ± 0,1932
Neutrofili aps. (10 ⁹ /l)	0,9 ± 0,3396	0,782 ± 0,1653	0,87 ± 0,1465	0,814 ± 0,2813
Eozinofili aps. (10 ⁹ /l)	0,00833 ± 0,0098	0,026 ± 0,0251	0,012 ± 0,004472	0,008 ± 0,008367
Bazofili aps. (10 ⁹ /l)	0,1505 ± 0,06348	0,1336 ± 0,02491	0,147 ± 0,02799	0,1412 ± 0,06019
Eritrociti (10 ¹² /l)	7,032 ± 0,5935	7,432 ± 0,669	7,158 ± 0,5852	6,644 ± 0,2188 +
Hemoglobin (g/l)	136,2 ± 15,05	145,6 ± 10,24	138,8 ± 13,83	129,2 ± 2,775 +
Hematokrit (l/l)	0,391 ± 0,05146	0,4204 ± 0,03879	0,391 ± 0,04507	0,3568 ± 0,0067 +
MCV (fl)	55,45 ± 2,665	56,58 ± 1,843	54,58 ± 2,823	53,74 ± 1,462
MCH (pg)	19,37 ± 0,5538	19,62 ± 0,7662	19,4 ± 0,6671	19,46 ± 0,4219
MCHC (g/l)	348,8 ± 7,6	347,2 ± 9,365	355,4 ± 9,099	362,2 ± 4,82 * ++
Trombociti (10 ⁹ /l)	358,5 ± 74,82	434,8 ± 78,21	434,8 ± 31,19	401 ± 68,26

* p<0,05, ** p<0,01 (u poređenju sa kontrolom): + p<0,05; ++ p<0,01 (u odnosu na MIX 1). Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fisherovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference, LSD*). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, n = 5. MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + 0,09 x 10⁹ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + 0,18 x 10⁹ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + 0,36 x 10⁹ ćelija/ml); MCV: srednji korpuskularni volumen, MCH: srednji korpuskularni hemoglobin, MCHC: srednja korpuskularna koncentracija hemoglobina; SFN - sulforafan; PA-MSHA - inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Sprovedenom BMD analizom nije izračunat interval pouzdanosti ni za jedan od izmerenih hematoloških parametara kod mužjaka pacova.

Kod ženki pacova tretiranih kombinacijom SFN i PA-MSHA uočene su značajnije promene hematoloških parametara koji se dovode u vezu sa anemijom (broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, hematokrita, kao i MCV, MCH i MCHC parametri). Broj eritrocita, kao i koncentracija hematokrita bili su niži u sve 3 tretirane grupe u odnosu na kontrolu, dok je koncentracija MCHC bila povišena. Dodatno, u MIX 2 i MIX 3 grupama dobijen je povišen nivo hemoglobina, a snižene vrednosti MCH parametra u odnosu na kontrolu. Samo ženke pacova tretirane najnižom dozom SFN i PA-MSHA (MIX 1) imale su niži nivo MCV u krvi u odnosu na kontrolu (p<0,05). Pored toga, broj ukupnih neutrofila kao i % neutrofila u krvi bio je viši u tretiranim grupama u odnosu na kontrolu, i to najviši u MIX 1 grupi (Tabela 41).

Tabela 41. Uticaj kombinovane primene rastućih doza sulforafana i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na hematološke parametre u krvi ženki pacova nakon 28 dana ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3
Leukociti (10 ⁹ /l)	4,25 ± 1,205	4,9 ± 1,29	4,56 ± 1,078	4,42 ± 1,696
Limfociti (%)	71,97 ± 5,815	67,44 ± 8,443	71,96 ± 1,808	68,14 ± 4,198
Monociti (%)	9,2 ± 3,976	6,24 ± 3,079	5,42 ± 2,142	7,1 ± 4,142
Neutrofili (%)	16,72 ± 3,195	23,78 ± 6,264 **	20,42 ± 2,875	22,14 ± 1,95 *
Eozinofili (%)	0,3 ± 0,3464	0,32 ± 0,1924	0,54 ± 0,3209	0,84 ± 0,9762
Bazofili (%)	1,817 ± 0,7548	2,22 ± 0,6611	1,66 ± 0,6986	1,78 ± 0,5541
Limfociti aps. (10 ⁹ /l)	3,105 ± 1,055	3,25 ± 0,7303	3,28 ± 0,7779	3,028 ± 1,27
Monociti aps. (10 ⁹ /l)	0,37 ± 0,1231	0,332 ± 0,2221	0,246 ± 0,09017	0,298 ± 0,1686
Neutrofili aps. (10 ⁹ /l)	0,685 ± 0,1198	1,188 ± 0,5493 *	0,936 ± 0,2886	0,976 ± 0,3737
Eozinofili aps. (10 ⁹ /l)	0,01333 ± 0,0137	0,016 ± 0,01342	0,024 ± 0,0114	0,04 ± 0,04583
Bazofili aps. (10 ⁹ /l)	0,078 ± 0,03986	0,1142 ± 0,05335	0,0754 ± 0,03283	0,0762 ± 0,03013
Eritrociti (10 ¹² /l)	7,115 ± 0,8097	6,31 ± 0,4101 *	5,862 ± 0,4858 **	5,862 ± 0,4012 **
Hemoglobin (g/l)	138,7 ± 14,25	125,6 ± 8,877	119,2 ± 8,379 **	118,8 ± 6,573 **
Hematokrit (l/l)	0,3962 ± 0,04826	0,3402 ± 0,0239 *	0,321 ± 0,0277 **	0,3218 ± 0,020 **
MCV (fl)	55,65 ± 1,758	53,9 ± 1,075 *	54,72 ± 1,145	54,94 ± 1,115
MCH (pg)	19,52 ± 0,5037	19,88 ± 0,3962	20,32 ± 0,4658 *	20,28 ± 0,7563 *
MCHC (g/l)	350,8 ± 7,859	369,2 ± 3,962 ***	371,6 ± 6,27 ****	369,2 ± 7,014 ***
Trombociti (10 ⁹ /l)	451 ± 137,6	463,6 ± 44,21	430,4 ± 73,89	498,8 ± 79,24

* p<0,05, ** p<0,01 (u poređenju sa kontrolom). Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, n = 5. MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + 0,09 x 10⁹ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + 0,18 x 10⁹ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + 0,36 x 10⁹ ćelija/ml); MCV: srednji korpuskularni volumen, MCH: srednji korpuskularni hemoglobin, MCHC: srednja korpuskularna koncentracija hemoglobina; SFN - sulforafan; PA-MSHA - inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Kao i kod mužjaka pacova, sprovedena BMD analiza nije izračunala interval pouzdanosti ni za jedan od izmerenih hematoloških parametara kod ženki pacova.

4.3.2.5. Uticaj na biohemijske parametre

4.3.2.5.1. Sulforafan

Sukakutna ekspozicija SFN na biohemijske parametre u serumu mužjaka pacova prikazani su u Tabeli 42. Pored lipidnog profila (holesterol, HDL, LDL, trigliceridi), izmereni su i parametri funkcije jetre i to: ukupni proteini, albumin, AST, ALT, kao i alkalna fosfataza. Dodatno, određeni su parametri koji, zajedno sa ostalom krvnom slikom mogu ukazati na nastanak anemije i to: gvožđe, TIBC i UIBC.

SFN u primenjenim dozama nije uticao na lipidni status mužjaka pacova. Jedina statistički značajna razlika zabeležena je u grupi SFN 3 gde je nivo holesterola bio viši u odnosu na SFN 1 grupu, a p <0,05. Od parametara koji opisuju funkciju jetre, porast koncentracije

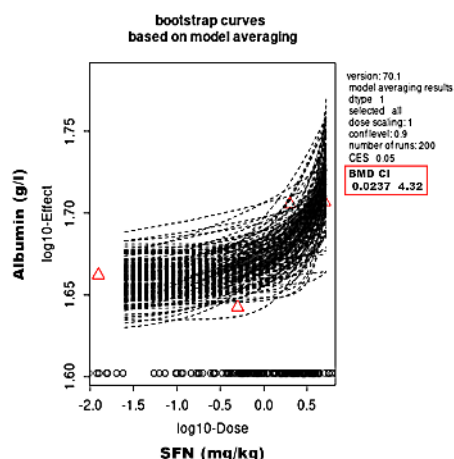
albumina izdvojio se kao statistički značajan u grupama SFN 2 i SFN 3 u odnosu na kontrolu i na SFN 1 grupu, dok su ukupni proteini bili statistički značajno veći u SFN 3 grupi u odnosu na SFN 1. Primena SFN uticala je i na koncentraciju UIBC pa je dobijen porast u SFN 2 grupi u odnosu na kontrolu. Takođe, nivo hlorida pokazao je trend rasta sa porastom doze SFN (Tabela 42).

Tabela 42. Uticaj rastućih doza sulforafana na biohemijske parametre u serumu mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	SFN 1	SFN 2	SFN 3
Holesterol (mmol/l)	2,052 ± 0,2688	1,936 ± 0,2267	2,172 ± 0,1907	2,298 ± 0,3087 *
HDL (mmol/l)	1,315 ± 0,2141	1,276 ± 0,1671	1,552 ± 0,1497	1,484 ± 0,2016
LDL (mmol/l)	0,245 ± 0,06221	0,158 ± 0,1139	0,224 ± 0,08081	0,244 ± 0,1677
Trigliceridi (mmol/l)	1,443 ± 0,2498	1,28 ± 0,2965	1,294 ± 0,2906	1,254 ± 0,3728
Kreatinin (umol/l)	43,17 ± 10,61	37,6 ± 6,841	38,2 ± 7,259	39,8 ± 5,541
Mokraćna kiselina (umol/l)	238 ± 132,9	179,4 ± 88,37	217 ± 145,3	224,6 ± 141
Proteini ukupni (g/l)	70 ± 5,441	65,8 ± 5,357	71,6 ± 5,941	73,6 ± 5,03 *
Albumin (g/l)	46 ± 2,757	44 ± 3,317	51 ± 5,523 * *	51 ± 3,464 * *
AST (u/l)	223,5 ± 163	186,6 ± 77,56	219,2 ± 62,05	159,2 ± 28,35
ALT (u/l)	68 ± 33,06	63,8 ± 17,64	65,6 ± 11,01	61,4 ± 3,209
Alkalna fosfataza (u/l)	300,3 ± 42,79	310,6 ± 55,12	283,6 ± 93,84	254,2 ± 43,91
Gvožđe (umol/l)	35,53 ± 7,357	30,58 ± 5,482	32,5 ± 3,597	33,36 ± 2,851
TIBC (umol/l)	99,5 ± 12,13	96,8 ± 9,094	110,4 ± 11,41	98,4 ± 4,827
UIBC (umol/l)	64,17 ± 7,41 #####	66 ± 6,892 #	77,8 ± 7,95 **	64,8 ± 3,633 #####
Hloridi (mmol/l)	99 ± 1,789	101,6 ± 0,8944 *	101,4 ± 1,517 *	101,6 ± 1,517 *
Kalcijum (mmol/l)	3,183 ± 0,3885	2,876 ± 0,3808	3,182 ± 0,3926	3,134 ± 0,427
Fosfor neorganski (mmol/l)	3,603 ± 1,076	3,356 ± 0,7547	3,742 ± 0,7851	3,552 ± 0,5866
Magnezijum (mmol/l)	1,667 ± 0,3723	1,428 ± 0,293	1,53 ± 0,3323	1,576 ± 0,3559

* p<0,05; ** p<0,01 (u poređenju sa kontrolom); + p<0,05 (u poređenju sa SFN 1); # p<0,05; ##### p<0,0001 (u poređenju sa SFN 2 grupom); Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije. SFN 1: sulforafan (0., mg/kg t.m/dan); SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m/dan); SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m/dan); HDL: lipoprotein visoke gustine, LDL: lipoprotein niske gustine, AST: aspartat aminotransferaza, ALT: alanin aminotransferaza, TIBC: totalni kapacitet vezivanja gvožđa, UIBC: nezasićeni (slobodni) kapacitet vezivanja gvožđa

Za dalje ispitivanje uticaja SFN na biohemijske parametre kod mužjaka pacova, u smislu odnosa doza-odgovor, sprovedena je BMD analiza. Od svih ispitivanih biohemijskih parametara dozna zavisnost dobijena je samo za sadržaj albumina u serumu mužjaka pacova. Dobijeni grafik ukazuje na pozitivnu korelaciju između primenjene doze SFN i promene koncentracije albumina u serumu pacova (Slika 34), sa gornjom i donjom granicom pouzdanosti od 95% BMDU i BMDL, redom. Izračunati BMDL koji može dovesti do 5% povećanja koncentracije albumina, u serumu pacova iznosio je 0,0237 mg/kg t.m./dan SFN. Ističe se da je dobijen interval pouzdanosti zadovoljio prethodno postavljene kriterijume za potvrdu dozne zavisnosti (Slika 34).



Slika 34. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih doza sulforafana i biohemijskog parametra albumina kod mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije
SFN (0,5, 2 i 5 mg/kg t.m/dan); Broj iteracija: 200. SFN: sulforafan

Kao i kod mužjaka pacova, primena SFN nije dovela do promene lipidnog statusa ženki pacova, bez obzira na primenjenu dozu. Međutim, za razliku od tretiranih mužjaka, SFN-tretman nije uticao na parametre funkcije jetre kod ženke pacova, kao ni na parametre anemije (gvožđe, TIBC i UIBC). Jedina statistički značajna razlika između grupa uočena je u koncentraciji hlorida koja je bila niža u SFN 2 grupi u odnosu na SFN 1 ($p < 0,05$).

Tabela 43. Uticaj rastućih doza sulforafana na biohemijske parametre u serumu ženki pacova nakon 28 dana ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	SFN 1	SFN 2	SFN 3
Holesterol (mmol/l)	2,895 ± 0,5635	2,912 ± 0,3595	2,846 ± 0,4056	2,908 ± 0,398
HDL (mmol/l)	2,022 ± 0,3849	2,028 ± 0,3061	2,178 ± 0,396	2,016 ± 0,4417
LDL (mmol/l)	0,1883 ± 0,0694	0,32 ± 0,06164	0,28 ± 0,1608	0,366 ± 0,2536
Trigliceridi (mmol/l)	1,65 ± 0,4855	1,238 ± 0,304	1,212 ± 0,4639	1,158 ± 0,423
Kreatinin (umol/l)	46,33 ± 7,607	45,4 ± 7,301	42,4 ± 6,107	65 ± 53,14
Mokraćna kiselina (umol/l)	238,3 ± 109,1	247,4 ± 112,2	210,4 ± 90,17	214,4 ± 125,4
Proteini ukupni (g/l)	73,17 ± 6,94	78,6 ± 9,529	75,2 ± 8,955	74,6 ± 3,507
Albumin (g/l)	48 ± 3,225	49,4 ± 6,107	49 ± 5,099	44,8 ± 5,263
AST (u/l)	347,2 ± 228	407 ± 144	306,8 ± 102,2	275,2 ± 109,9
ALT (u/l)	82,83 ± 45,21	91,6 ± 16,46	73 ± 9,592	68 ± 16,81
Alkalna fosfataza (u/l)	192,7 ± 42,87	225,2 ± 14,72	186,4 ± 16,68	208,6 ± 33,63
Gvožđe (umol/l)	53,98 ± 12,97	50,22 ± 7,185	58,24 ± 12,44	47,98 ± 9,452
TIBC (umol/l)	106 ± 11,63	112,2 ± 16,02	114,2 ± 17,41	110,6 ± 6,841
UIBC (umol/l)	52 ± 7,51	62,4 ± 10,69	56,2 ± 6,058	62,8 ± 13,99
Hloridi (mmol/l)	103 ± 1,414	105,4 ± 1,949	102,4 ± 1,14⁺	104,8 ± 3,271
Kalcijum (mmol/l)	3,367 ± 0,4969	3,282 ± 0,4005	3,28 ± 0,2928	3,08 ± 0,417
Fosfor neorganski (mmol/l)	3,493 ± 1,036	3,856 ± 0,9278	3,494 ± 0,528	3,602 ± 1,034
Magnezijum (mmol/l)	1,623 ± 0,3406	1,61 ± 0,275	1,516 ± 0,2481	1,472 ± 0,2794

+ $p < 0,05$ (u poređenju sa SFN 1); Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti $\pm$ standardne devijacije. SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m/dan); SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m/dan); SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m/dan); HDL: lipoprotein visoke gustine, LDL: lipoprotein niske gustine, AST: aspartat aminotransferaza, ALT: alanin aminotransferaza, TIBC: totalni kapacitet vezivanja gvožđa, UIBC: nezasićeni (slobodni) kapacitet vezivanja gvožđa

Sprovedena BMD analiza kod ženki pacova nije izračunala interval pouzdanosti ni za jedan od ispitivanih biohemijskih parametara što ukazuje na nepostajanje odnosa primenjena doza - odgovor.

4.3.2.5.2. Inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Za razliku od SFN, PA-MSHA tretman doveo je do promena u koncentraciji LDL i triglicerida u serumu mužjaka pacova. U PA-MSHA 3 grupi uočen je značajan porast nivoa LDL u odnosu na kontrolu i PA-MSHA 1 grupu, dok je koncentracija triglicerida bila niža u PA-MSHA 3 grupi u odnosu na kontrolu i SFN 1 grupu ($p < 0,0001$). Pored toga, parametri funkcije bubrega (kreatinin i mokraćna kiselina) razlikovali su se u odnosu na kontrolu. Kreatinin je bio niži u svim tretiranim grupama, ali je jedino statistički značajno smanjenje koncentracije kreatinina dobijeno u grupi PA-MSHA 1. Što se tiče mokraćne kiseline, smanjenje koncentracije uočeno je u PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 grupama u odnosu na kontrolu. Dalje, promene su uočene i u parametrima funkcije jetre i to: smanjenje koncentracije albumina u svim tretiranim grupama u odnosu na kontrolu, kao i značajno smanjenje alkalne fosfataze u PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 grupama u odnosu na kontrolu i PA-MSHA 1 grupu. Primenjeni PA-MSHA tretman uticao je i na novoe gvožđa i TIBC pri čemu je dobijeno smanjenje gvožđa u grupama PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 u odnosu na kontrolu, odnosno PA-MSHA 3 u odnosu na PA-MSHA 1, dok je TIBC koncentracija bila niža u PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 u odnosu na PA-MSHA 1 ($p < 0,05$). Konačno, tretmanom-izazvana promena zabeležena je i u koncentraciji hlorida i kalcijuma nakon 28 dana (Tabela 44).

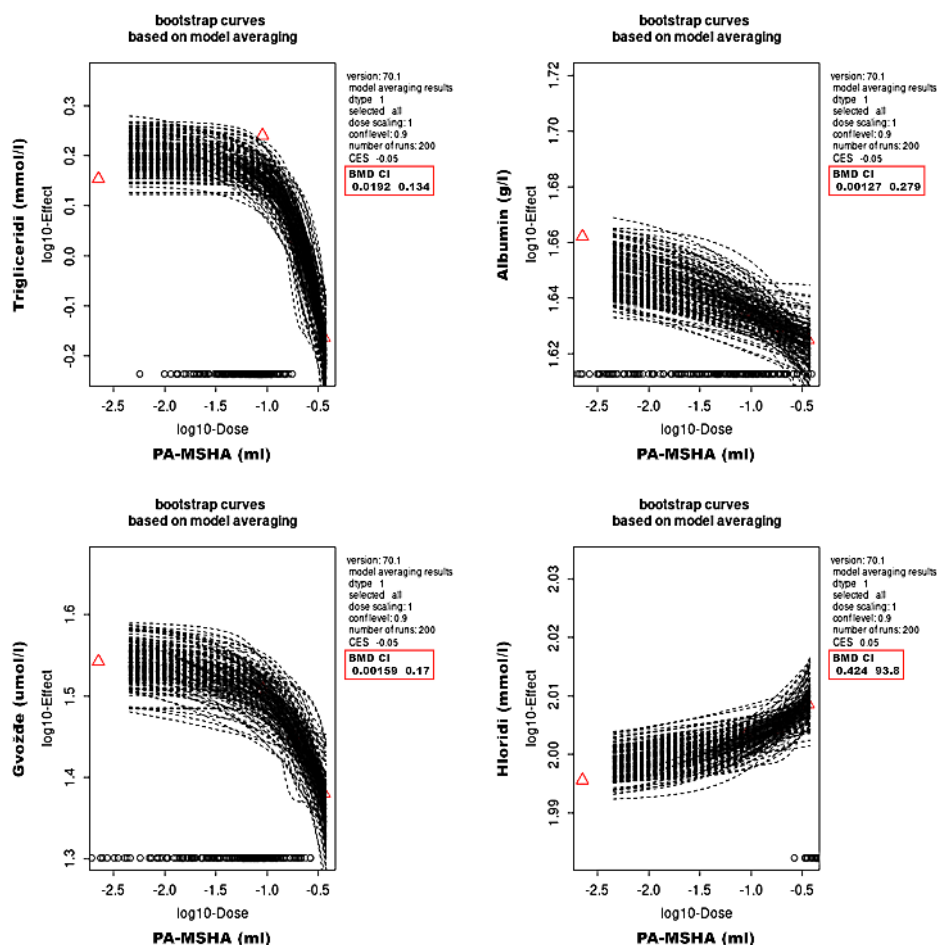
Tabela 44. Uticaj rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na biohemijske parametre u serumu mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	PA-MSHA 1	PA-MSHA 2	PA-MSHA 3
Holesterol (mmol/l)	2,052 $\pm$ 0,2688	2,174 $\pm$ 0,2543	2,112 $\pm$ 0,1219	1,962 $\pm$ 0,09121
HDL (mmol/l)	1,315 $\pm$ 0,2141	1,466 $\pm$ 0,2617	1,334 $\pm$ 0,08792	1,248 $\pm$ 0,04817
LDL (mmol/l)	0,245 $\pm$ 0,06221	0,262 $\pm$ 0,1085	0,272 $\pm$ 0,1467	0,4 $\pm$ 0,031 ** +
Trigliceridi (mmol/l)	1,443 $\pm$ 0,2498	1,774 $\pm$ 0,3853	1,112 $\pm$ 0,3038	0,7 $\pm$ 0,14 *** ****
Kreatinin (umol/l)	43,17 $\pm$ 10,61	33,2 $\pm$ 4,087 *	35 $\pm$ 3,808	37,8 $\pm$ 5,119
Mokraćna kiselina (umol/l)	238 $\pm$ 132,9	147,6 $\pm$ 99,62	117,8 $\pm$ 30,29 *	115,2 $\pm$ 47,17 *
Proteini ukupni (g/l)	70 $\pm$ 5,441	71 $\pm$ 5,701	67,6 $\pm$ 1,342	66,6 $\pm$ 3,13
Albumin (g/l)	46 $\pm$ 2,757	43,2 $\pm$ 1,924 *	42,6 $\pm$ 0,8944 *	42,2 $\pm$ 1,643 **
AST (u/l)	223,5 $\pm$ 163	141,6 $\pm$ 47,53	245,8 $\pm$ 102,4	282,6 $\pm$ 65,92
ALT (u/l)	68 $\pm$ 33,06	61,4 $\pm$ 4,669	54,8 $\pm$ 6,797	56,6 $\pm$ 7,47
Alkalna fosfataza (u/l)	300,3 $\pm$ 42,79	300,8 $\pm$ 49,86	169 $\pm$ 34***** ****	131 $\pm$ 10***** ****
Gvožđe (umol/l)	35,53 $\pm$ 7,357	32,4 $\pm$ 3,207	28,54 $\pm$ 3,949 *	24,2 $\pm$ 2,997 ** +
TIBC (umol/l)	99,5 $\pm$ 12,13	105,6 $\pm$ 10,88	89,4 $\pm$ 6,656 +	91,2 $\pm$ 5,586 +

UIBC (umol/l)	64,17 ± 7,414	73,2 ± 8,701	61 ± 8,093	72,2 ± 12,38
Hloridi (mmol/l)	99 ± 1,789	100,8 ± 1,483	101 ± 1,414 *	102 ± 1 **
Kalcijum (mmol/l)	3,183 ± 0,3885	2,976 ± 0,2403	2,712 ± 0,1355 **	2,628 ± 0,15 ** +
Fosfor neorganski (mmol/l)	3,603 ± 1,076	3,108 ± 0,2253	3,068 ± 0,5291	3,262 ± 0,5829
Magnezijum (mmol/l)	1,667 ± 0,3723	1,33 ± 0,2064	1,398 ± 0,1469	1,918 ± 1,328

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001 (u poređenju sa kontrolom); + p<0,05; ++++ p<0,0001 (u poređenju sa PA-MSHA 1); Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije. PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,09 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,18 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,36 x 10⁹ ćelija/ml); HDL: lipoprotein visoke gustine, LDL: lipoprotein niske gustine, AST: aspartat aminotransferaza, ALT: alanin aminotransferaza, TIBC: totalni kapacitet vezivanja gvožđa, UIBC: nezasićeni (slobodni) kapacitet vezivanja gvožđa

Grafici dobijeni BMD analizom ukazuju na pozitivnu korelaciju samo između primenjene doze PA-MSHA i koncentracije hlorida u serumu pacova, dok je u ostalim grafikonima prikazanam na slici 35 uočena negativna korelacija između doze PA-MSHA i biohemijskih parametara. Odnosno, dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost PA-MSHA da dovede do 5% povećanja koncentracije hlorida u serumu pacova kada se primenjuje u dozi od 0,424 x 10⁹ ćelija/ml (BMDL), a do 5% smanjenja triglicerida, albumina, alkalne fosfataze i gvožđa kada se primenjuje u koncentracijama od: 0,0192 x 10⁹ ćelija/ml, 0,00127 x 10⁹ ćelija/ml, 0,0363 x 10⁹ ćelija/ml, 0,00159 x 10⁹ ćelija/ml, redom (Slika 35).



Slika 35. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i biohemijskih parametara kod mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije

PA-MSHA (0,09 x 10⁹ ćelija/ml; 0,18 x 10⁹ ćelija/ml; 0,36 x 10⁹ ćelija/ml); Broj iteracija: 200. PA-MSHA: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Biohemijski parametri praćeni u serumu ženki pacova nakon subakutne ekspozicije rastućim dozama PA-MSHA prikazani su u Tabeli 45. Promene lipidnog statusa ženki pacova ogledaju se u povećanju koncentracije LDL holesterola u PA-MSHA 2 grupi (u odnosu na kontrolu) i značajnom smanjenju nivoa triglicerida u sve 3 tretirane grupe u odnosu na kontrolu. Dalje, parametri funkcije bubrega, ali i koncentracija kalcijuma u serumu, bili su sniženi u svim tretiranim grupama u odnosu na kontrolu. Nivo ukupnih proteina razlikovao se samo u PA-MSHA 2 grupi, dok je alkalna fosfataza bila statistički značajno snižena u PA-MSHA 3 grupi u odnosu na kontrolu. Konačno, i ako je koncentracija gvožđa bila slična između kontrole i tretiranih grupa, razlika je uočena u TIBC parametru anemije. U odnosu na kontrolu i PA-MSHA 1 grupu, TIBC vrednosti bile su niže u PA-MSHA 2 grupi, dok je u PA-MSHA 3 grupi TIBC bio niži u odnosu na PA-MSHA 2 (p<0,05). UIBC se razlikovao između tretiranih grupa i u PA-MSHA 2 grupi koncentracija UIBC parametra bila je značajno niža u odnosu na PA-MSHA 1 (Tabela 45).

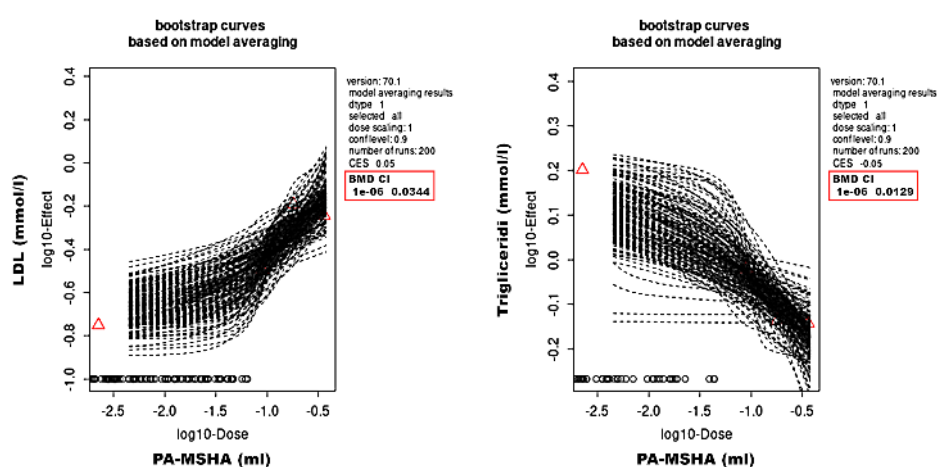
Tabela 45. Uticaj rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na biohemijske parametre u serumu ženki pacova nakon 28 dana ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	PA-MSHA 1	PA-MSHA 2	PA-MSHA 3
Holesterol (mmol/l)	2,895 ± 0,5635	2,864 ± 0,3166	2,734 ± 0,3134	2,95 ± 0,1325
HDL (mmol/l)	2,022 ± 0,3849	2,094 ± 0,2323	1,816 ± 0,2461	2,044 ± 0,1212
LDL (mmol/l)	0,1883 ± 0,0694	0,336 ± 0,1126	0,844 ± 0,8215 *	0,574 ± 0,06804
Trigliceridi (mmol/l)	1,65 ± 0,4855	0,958 ± 0,0898 **	0,78 ± 0,3234 ***	0,73 ± 0,1384 ***
Kreatinin (umol/l)	46,33 ± 7,607	36,4 ± 4,879 **	36,4 ± 2,608 **	36,4 ± 4,393 **
Mokraćna kiselina (umol/l)	238,3 ± 109,1	91,2 ± 22,43 **	109,1 ± 61,1 *	120,8 ± 79,2 *
Proteini ukupni (g/l)	73,17 ± 6,94	71 ± 3,674	66,6 ± 4,506 *	72 ± 3,742
Albumin (g/l)	48 ± 3,225	46,40 ± 1,817	43 ± 2,449	46,4 ± 3,578
AST (u/l)	347,2 ± 228	211,6 ± 45,58	239 ± 81,69	201,8 ± 76,72
ALT (u/l)	82,83 ± 45,21	57 ± 8,216	64,4 ± 13,78	57,2 ± 10,64
Alkalna fosfataza (u/l)	192,7 ± 42,87	173 ± 31,98	153,2 ± 49,88	130,2 ± 18,21 *
Gvožđe (umol/l)	53,98 ± 12,97	48,46 ± 6,423	51,08 ± 7,238	49,98 ± 5,862
TIBC (umol/l)	106 ± 11,63	108,6 ± 7,021	80,4 ± 24,9 ** ++	101 ± 7,746 #
UIBC (umol/l)	52 ± 7,51	60,6 ± 3,912	40,4 ± 12,99 ++	51,2 ± 12,87
Hloridi (mmol/l)	103 ± 1,414	102 ± 1,581	112,4 ± 22,15	103,8 ± 3,114
Kalcijum (mmol/l)	3,367 ± 0,4969	2,878 ± 0,1299 *	2,762 ± 0,0327 **	2,846 ± 0,0926 **
Fosfor neorganski (mmol/l)	3,493 ± 1,036	2,988 ± 0,1675	2,674 ± 0,5389	2,91 ± 0,3093
Magnezijum (mmol/l)	1,623 ± 0,3406	1,204 ± 0,07335	1,268 ± 0,0502	1,586 ± 0,8345

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (u poređenju sa kontrolom); ++ p<0,01 (u poređenju sa PA-MSHA 1); # p<0,05 (u odnosu na PA-MSHA 2). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije. PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,09 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,18 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,36 x 10⁹ ćelija/ml); HDL: lipoprotein visoke gustine,

LDL: lipoprotein niske gustine, AST: aspartat aminotransferaza, ALT: alanin aminotransferaza, TIBC: totalni kapacitet vezivanja gvožđa, UIBC: nezasićeni (slobodni) kapacitet vezivanja gvožđa

Sprovedena je BMD analiza i za rezultate biohemijskih parametara ženki pacova tretiranih rastućim dozama PA-MSHA. Rezultati su prikazani grafikonima na slici 36. Nepravilne krive ukazuju na široki interval pouzdanosti i veliku razliku između izračunatih BMDL i BMDU, odnosno nepostojanje dozno-zavisne veze između primenjenih doza PA-MSHA i praćenih efekta (Slika 36). Interesantno je napomenuti da su zabeležene pojedine razlike u biohemijskim parametrima između mužjaka i ženki pacova nakon PA-MSHA tretmana. Na primer, kod mužjaka pacova zabeleženo je smanjenje koncentracije gvožđa, a kod ženki pacova dobijen je porast koncentracije LDL holesterola. Kod tretiranih pacova oba pola, uočava se smanjenje koncentracije triglicerida, ali kod ženki pacova nije dozno-zavisno. Pored toga, PA-MSHA nije dozno-zavisno uticao na nivo albumina u serumu mužjaka pacova, ali ne i ženki.



Slika 36. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i biohemijskih parametara kod ženki pacova nakon 28 dana ekspozicije

PA-MSHA ($0,09 \times 10^9$ ćelija/ml; $0,18 \times 10^9$ ćelija/ml; $0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); Broj iteracija: 200. PA-MSHA: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

4.3.2.5.3. Kombinovana primena imunomodulatora

Nivoi biohemijskih parametara kod mužjaka pacova tretiranih kombinacijom SFN i PA-MSHA u 3 dozna nivoa predstavljeni su u Tabeli 46. Statističkom obradom podataka i poređenjem svih grupa međusobno uočena je razlika između kontrole i MIX 1 grupe, odnosno grupe koja je bila tretirana najnižom dozom SFN i PA-MSHA. U MIX 1 grupi došlo je do porasta nivoa ukupnog i HDL holesterola, zatim mokraćne kiseline, ukupnih proteina, gvožđa, ali i TIBC faktora u odnosu na kontrolu. Ujedno, vrednosti pomenutih faktora bile su značajno više u odnosu na MIX 2 i MIX 3 grupu. Koncentracija hlorida bila je statistički značajno viša u MIX 2 grupi u odnosu na kontrolu, što je ujedno i jedina razlika dobijena između ove 2 grupe. Nivoi kalcijuma i magnezijuma takođe su bili značajno niži u MIX 2 i MIX 3 grupi u odnosu na MIX 1 (Tabela 46).

Tabela 46. Uticaj rastućih doza kombinovane primene sulforafana i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na biohemijske parametre u serumu mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3
Holesterol (mmol/l)	2,052 ± 0,2688	2,446 ± 0,2096 **	2,11 ± 0,06633 +	2,086 ± 0,1244 +
HDL (mmol/l)	1,315 ± 0,2141	1,716 ± 0,113 ***	1,416 ± 0,041 ++	1,42 ± 0,1007 ++
LDL (mmol/l)	0,245 ± 0,06221	0,198 ± 0,09311	0,24 ± 0,1366	0,284 ± 0,07503
Trigliceridi (mmol/l)	1,443 ± 0,2498	1,316 ± 0,1843	1,464 ± 0,3179	1,544 ± 0,2062
Kreatinin (umol/l)	43,17 ± 10,61	46,8 ± 7,294	38,2 ± 4,817	34,6 ± 4,278
Mokraćna kiselina (umol/l)	238 ± 132,9	410,6 ± 130,2 *	220,2 ± 90,36 +	174,2 ± 49,91 +
Proteini ukupni (g/l)	70 ± 5,441	76 ± 5,916 *	68 ± 2,55 +	69,6 ± 3,435 +
Albumin (g/l)	46 ± 2,757	45,8 ± 4,494	43,8 ± 1,095	43,6 ± 2,702
AST (u/l)	223,5 ± 163	185 ± 58,3	198,2 ± 64,86	182,2 ± 51,25
ALT (u/l)	68 ± 33,06	78,8 ± 21,65	61,8 ± 8,983	59,8 ± 5,357
Alkalna fosfataza (u/l)	300,3 ± 42,79	319 ± 78,28	285,6 ± 30,62	275 ± 46,6
Gvožđe (umol/l)	35,53 ± 7,357	44,08 ± 5,169 *	33,72 ± 3,794 ++	33,62 ± 5,086 ++
TIBC (umol/l)	99,5 ± 12,13	114,2 ± 10,64 *	99,4 ± 7,893 +	100 ± 7,176 +
UIBC (umol/l)	64,17 ± 7,414	70,2 ± 6,058	65,8 ± 5,586	66,4 ± 5,459
Hloridi (mmol/l)	99 ± 1,789	100,2 ± 1,924	102 ± 1,225 **	99,6 ± 1,14
Kalcijum (mmol/l)	3,183 ± 0,3885	3,466 ± 0,3982	2,988 ± 0,1859 +	2,99 ± 0,1281 +
Fosfor neorganski (mmol/l)	3,603 ± 1,076	3,818 ± 0,7741	2,938 ± 0,4741	3,106 ± 0,1788
Magnezijum (mmol/l)	1,667 ± 0,3723	1,968 ± 0,4273	1,54 ± 0,2446	1,51 ± 0,2286 +

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (u poređenju sa kontrolom); + p<0,05; ++ p<0,01 (u poređenju sa MIX 1). Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fisherovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, n = 5. MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + 0,09 x 10⁹ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + 0,18 x 10⁹ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + 0,36 x 10⁹ ćelija/ml); HDL: lipoprotein visoke gustine, LDL: lipoprotein niske gustine, AST: aspartat aminotransferaza, ALT: alanin aminotransferaza, TIBC: totalni kapacitet vezivanja gvožđa, UIBC: nezasićeni (slobodni) kapacitet vezivanja gvožđa. SFN - sulforafan; PA-MSHA - inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Kao i u prethodnom delu ispitivanja, sprovedena je BMD analiza u cilju identifikovanja odnosa doza-odgovor kod pacova tretiranih kombinacijom SFN i PA-MSHA. Međutim, ni za jedan od izmerenih biohemijskih parametara kod mužjaka pacova nije izračunat interval pouzdanosti.

Promene u nivoima biohemijskih parametara ženki pacova tretiranih kombinacijom SFN i PA-MSHA razlikovali su se od promena u nivoima biohemijskih parametara mužjaka. Koncentracije kreatinina, mokraćna kiseline, kalcijuma i magnezijuma bile su značajno niže u sve 3 tretirane grupe u odnosu na kontrolu. Pored toga, koncentracija neorganskog fosfora bila je niža u MIX 1 i MIX 2 u odnosu na kontrolu, dok su hloridi bili značajno sniženi samo u MIX 1 grupi. Od parametara lipidnog statusa, izdvojili su se LDL čije su vrednosti bile značajno više u odnosu na kontrolu samo u MIX 3, ali je i kod ostale 2 tretirane grupe pacova izmeren viši nivo LDL holesterola u odnosu na kontrolu. Dodatno,

niži nivo triglicerida dobijen je u MIX 2 i MIX 3 grupi u odnosu na kontrolu. Značajna razlika u biohemijskim parametrima između tretiranih grupa nije uočena (Tabela 47).

Tabela 47. Uticaj rastućih doza kombinovane primene sulforafana i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na biohemijske parametre u serumu ženki pacova nakon 28 dana ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3
Holesterol (mmol/l)	2,895 ± 0,5635	2,74 ± 0,2237	2,514 ± 0,1911	2,758 ± 0,2675
HDL (mmol/l)	2,022 ± 0,3849	1,93 ± 0,1567	1,758 ± 0,1865	1,938 ± 0,215
LDL (mmol/l)	0,1883 ± 0,0694	0,312 ± 0,07155	0,314 ± 0,1716	0,382 ± 0,1195 *
Trigliceridi (mmol/l)	1,65 ± 0,4855	1,276 ± 0,5875	0,972 ± 0,2567 *	1,07 ± 0,3843 *
Kreatinin (umol/l)	46,33 ± 7,607	36,8 ± 4,147 **	33,4 ± 1,14 **	34,6 ± 1,673 **
Mokraćna kiselina (umol/l)	238,3 ± 109,1	83,2 ± 38,11 **	112,8 ± 59 **	94,8 ± 15,83 **
Proteini ukupni (g/l)	73,17 ± 6,94	69,2 ± 3,114	68,4 ± 2,302	69 ± 3,317
Albumin (g/l)	48 ± 3,225	44,8 ± 1,789	42,2 ± 4,494 **	44,6 ± 2,408
AST (u/l)	256,2 ± 46	267,8 ± 98,15	268,8 ± 72,92	279 ± 105,3
ALT (u/l)	65,83 ± 7,9	62 ± 10,34	56,4 ± 8,877	63,6 ± 8,473
Alkalna fosfataza (u/l)	184 ± 42	175,4 ± 20,94	172,4 ± 31,75	182,4 ± 16,61
Gvožđe (umol/l)	53,98 ± 12,97	47,4 ± 7,194	44,62 ± 6,58	48,42 ± 5,322
TIBC (umol/l)	106 ± 11,63	95,2 ± 4,764	92,8 ± 9,576	102,8 ± 9,094
UIBC (umol/l)	52 ± 7,51	47,8 ± 3,701	48 ± 12,35	54,2 ± 10,06
Hloridi (mmol/l)	103 ± 1,414	89,8 ± 20,09 *	99,6 ± 0,5477	100,2 ± 0,8367
Kalcijum (mmol/l)	3,367 ± 0,4969	2,77 ± 0,1265 **	2,74 ± 0,1235 **	2,816 ± 0,0767 **
Fosfor neorganski (mmol/l)	3,493 ± 1,036	2,32 ± 0,3132 **	2,316 ± 0,1016 **	2,908 ± 0,3106
Magnezijum (mmol/l)	1,623 ± 0,3406	1,2 ± 0,09478 **	1,12 ± 0,1067 ***	1,192 ± 0,0319 **

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (u poređenju sa kontrolom). Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, n = 5. MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + 0,09 x 10⁹ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + 0,18 x 10⁹ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + 0,36 x 10⁹ ćelija/ml); HDL: lipoprotein visoke gustine, LDL: lipoprotein niske gustine, AST: aspartat aminotransferaza, ALT: alanin aminotransferaza, TIBC: totalni kapacitet vezivanja gvožđa, UIBC: nezasićeni (slobodni) kapacitet vezivanja gvožđa. SFN - sulforafan; PA-MSHA - inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Takođe, i kod ženki pacova sprovedena BMD analiza za kombinovanu primenu SFN i PA-MSHA za efekte na biohemijske parametre nije izračunat interval pouzdanosti.

4.3.2.6. Uticaj na nivoe hormona

4.3.2.6.1. Sulforafan

U serumu mužjaka pacova izmereni su nivoi hormona štitaste žlezde iz kojih je izračunat T3/T4 odnos, kao i nivo testosterona nakon 28 dana tretmana SFN. Jedina statistički značajna razlika praćenih tiroidnih hormona u odnosu na kontrolu dobijena je u SFN 2 grupi u kojoj je nivo T3 u serumu bio povišen. Poređenjem svih eksperimentalnih grupa

međusobno, uočena je razlika između SFN 2 i SFN 1 grupe i to u nivou T3, T4 i FT3. FT3 je bio značajno povišen i u SFN 3 grupi u odnosu na SFN 1. Dodatno, nivo T3 u serumu bio je značajno niži u SFN 3 grupi u odnosu na SFN 2 ($p < 0,01$). U sve tri tretirane grupe nivo testosterona je bio niži u odnosu na kontrolu ali jedina statistički značajna razlika uočena je u grupi SFN 2. Međutim, nije bilo značajne razlike u nivou testosterona između tretiranih grupa (Tabela 48).

Tabela 48. Uticaj rastućih doza sulforafana na nivoe tiroidnih hormona i testosterona u serumu mužjaka pacova nakon oralne subakutne ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	SFN 1	SFN 2	SFN 3
T3 (nmol/l)	1,57 ± 0,1906	1,474 ± 0,2108	1,86 ± 0,24 * ++	1,498 ± 0,1018 ##
T4 (nmol/l)	66,23 ± 12,97	63,38 ± 8,644	79,7 ± 13,02 +	71,94 ± 7,722
T3/T4	0,024 ± 0,0025	0,023 ± 0,0034	0,024 ± 0,0054	0,024 ± 0,0054
FT3 (pmol/l)	4,517 ± 0,8681	3,84 ± 0,8234	5,74 ± 1,126 ++	4,26 ± 0,3782 ++
FT4 (pmol/l)	30,63 ± 7,761	30,58 ± 4,53	35,36 ± 5,819	32,18 ± 4,606
Testosteron (ng/ml)	3,937 ± 2,722	1,838 ± 0,5101	1 ± 0,35 *	2,73 ± 1,928

* $p < 0,05$ (u poređenju sa kontrolom); + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ (u poređenju sa SFN 1); ## $p < 0,01$ (u poređenju sa SFN 2); Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije. SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m/dan); SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m/dan); SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m/dan); T3: trijodotironin; T4: tiroksin; FT3: slobodni trijodotironin; FT4: slobodni tiroksin

Za dalje ispitivanje odnosa primenjene doze SFN i promene nivoe hormona u serumu mužjaka pacova, sprovedena je BMD analiza. Međutim, ni za jedan od izmerenih hormona nije izračunat dozni interval pouzdanosti, odnosno uočene promene nisu zavisile od primenjenog doze SFN.

Kao i kod mužjaka pacova, izmereni su nivoi hormona u serumu ženki pacova i predstavljeni u Tabeli 49. Između tretiranih grupa i kontrole nije postojala značajna razlika u rezultatima za nivo T3, T4, FT3 hormona, testosterona, kao i za izračunat T3/T4 odnos. Međutim, koncentracija FT4 u serumu ženki pacova u SFN 2 grupi bila je značajno viša u odnosu na kontrolu i SFN 1 grupu. Dodatno, razlika između SFN 1 i SFN 2 uočena je i u nivou T4 hormona koji je bio značajno viši u SFN 2 grupi.

Tabela 49. Uticaj rastućih doza sulforafana na nivoe tiroidnih hormona i testosterona u serumu ženki pacova nakon oralne subakutne ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	SFN 1	SFN 2	SFN 3
T3 (nmol/l)	1,427 ± 0,1941	1,326 ± 0,1576	1,55 ± 0,1975	1,522 ± 0,3333
T4 (nmol/l)	51,22 ± 10,14	47,26 ± 11,95	67,46 ± 19,32 +	54,12 ± 12,56
T3/T4	0,028 ± 0,0021	0,029 ± 0,0069	0,024 ± 0,0036	0,028 ± 0,0045
FT3 (pmol/l)	4,267 ± 0,8824	3,98 ± 0,638	4,76 ± 0,6804	4 ± 0,9618
FT4 (pmol/l)	24,5 ± 3,94	23,28 ± 5,616	32,5 ± 6,975 * +	26,88 ± 7,994
Testosteron (ng/ml)	0,04333 ± 0,0326	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,056 ± 0,04336

* $p < 0,05$ (u poređenju sa kontrolom); + $p < 0,05$ (u poređenju sa SFN 1). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije. SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg

t.m/dan); SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m/dan); SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m/dan); T3: trijodotironin; T4: tiroksin; FT3: slobodni trijodotironin; FT4: slobodni tiroksin.

Modelovanje odnosa doza-odgovor sprovedeno je i za nivo hormona kod ženki pacova tretiranih SFN, ali ni za jedan od izmerenih hormona nije izračunat dozni interval pouzdanosti, odnosno uočene promene u serumu ženki pacova nisu zavisile od primenjene doze SFN.

4.3.2.6.2. Inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Ista analiza za određivanje nivoa hormona u serumu mužjaka pacova sprovedena je i u eksperimentalnim grupama tretiranim rastućim dozama PA-MSHA tokom 28 dana. Dobijeni rezultati kao i razlika između grupa predstavljeni su u Tabeli 50. Doza PA-MSHA primenjena u PA-MSHA 2 grupi ($0,18 \times 10^9$ ćelije/ml) je dovela do statistički značajnog smanjenja nivoa FT3 u odnosu na kontrolu, što može da ukazuje na specifičan odgovor na primenjenu dozu. Pored toga, uočeno je povećanje nivoa FT4, pri čemu je statistički značajna razlika uočena samo između PA-MSHA 3 i kontrolne grupa.

Tabela 50. Uticaj rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na nivo tiroidnih hormona i testosterona u serumu mužjaka pacova nakon subakutne ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	PA-MSHA 1	PA-MSHA 2	PA-MSHA 3
T3 (nmol/l)	$1,57 \pm 0,1906$	$1,492 \pm 0,1287$	$1,416 \pm 0,1189$	$1,51 \pm 0,16$
T4 (nmol/l)	$66,23 \pm 12,97$	$65,52 \pm 5$	$58,86 \pm 5,82$	$60,6 \pm 5,74$
T3/T4	$0,024 \pm 0,0025$	$0,023 \pm 0,0028$	$0,024 \pm 0,0032$	$0,025 \pm 0,0030$
FT3 (pmol/l)	$4,517 \pm 0,8681$	$4,12 \pm 0,507$	$3,36 \pm 0,2302^{**}$	$3,84 \pm 0,5079$
FT4 (pmol/l)	$28 \pm 3,061$	$28,14 \pm 2,071$	$29,96 \pm 2,536$	$31,64 \pm 3,2^{*}$
Testosteron (ng/ml)	$3,937 \pm 2,722$	$2,798 \pm 2,118$	$1,652 \pm 1,32$	$2,696 \pm 2,375$

** $p < 0,01$ (u poređenju sa kontrolom). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti $\pm$ standardne devijacije. PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); T3: trijodotironin; T4: tiroksin; FT3: slobodni trijodotironin; FT4: slobodni tiroksin

Daljim modelovanjem odnosa primenjene doze PA-MSHA i promene nivoa hormona u serumu mužjaka pacova, nije dobijen dozno-zavisni rezultat koji zadovoljava prethodno postavljene kriterijume pouzdanosti (BMDU/BMDL manje od 100).

Kod ženki pacova, PA-MSHA 1 i PA-MSHA 3 su značajno povećali nivo T3, pri čemu je efekat PA-MSHA 3 bio izraženiji što ukazuju na potencijalno dozno-zavistan odgovor. Pored toga, obe doze su izazvale slično povećanje FT3 nivoa u serumu ženki pacova. Poređenjem svih eksperimentalnih grupa međusobno, uočena je razlika između PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 grupe. U serumu ženki pacova tretiranih najvišom koncentracijom PA-MSHA (PA-MSHA 3) nivo T3 bio je značajno viši u odnosu na PA-MSHA 2, a posledično i izračunati T3/T4 odnos (Tabela 51).

Tabela 51. Uticaj rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na nivoe tiroidnih hormona i testosterona u serumu ženki pacova nakon subakutne ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	PA-MSHA 1	PA-MSHA 2	PA-MSHA 3
T3 (nmol/l)	1,427 ± 0,086	1,514 ± 0,0853 *	1,4 ± 0,091	1,56 ± 0,0826 ** #
T4 (nmol/l)	51,22 ± 10,14	57,36 ± 9,507	61,1 ± 11,7	53,26 ± 6,749
T3/T4	0,029 ± 0,002	0,027 ± 0,0036	0,025 ± 0,0023	0,030 ± 0,0027 #
FT3 (pmol/l)	4 ± 0,52	4,58 ± 0,1643 *	4 ± 0,34	4,6 ± 0,5099 *
FT4 (pmol/l)	24,5 ± 3,94	30,34 ± 4,612	36,54 ± 14,38	28,34 ± 4,154
Testosteron (ng/ml)	0,04333 ± 0,0326	0,038 ± 0,01789	0,176 ± 0,274	0,03 ± 0

* p<0,05; ** p<0,01 (u poređenju sa kontrolom); # p<0,05 (u poređenju sa PA-MSHA 2). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije. PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,09 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,18 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,36 x 10⁹ ćelija/ml); T3: trijodotironin; T4: tiroksin; FT3: slobodni trijodotironin; FT4: slobodni tiroksin

Kao i u dosadašnjem delu istraživanja, sprovedena je BMD analiza u cilju boljeg razumevanja odnosa primenjene doze PA-MSHA i odgovora korišćenjem PROAST softvera. Međutim, ni za jedan od izmerenih hormona nije izračunat dozni interval pouzdanosti, odnosno uočene promene hormona u serumu ženki pacova nisu zavisile od primenjene doze PA-MSHA.

4.3.2.6.3. Kombinovana primena imunomoduatora

Kod mužjaka pacova tretiranih kombinacijom SFN i PA-MSHA uočen je porast nivoa T4 hormona u serumu u sve 3 eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolu, pri čemu je efekat bio izraženiji u grupama tretiranim većom dozom SFN i PA-MSHA. Pored toga, nivo T4 bio je značajno viši u MIX 3 grupi u odnosu na MIX 1 (p<0.01) i MIX 2 (p<0.05). Međutim, promena nivoa T3 nije uticala na T3/T4 odnos, odnosno održan je balans između T3 i T4 hormona u serumu (Tabela 52).

Tabela 52. Uticaj kombinovane primene rastućih doza sulforafana i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na nivoe tiroidnih hormona i testosterona u serumu mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3
T3 (nmol/l)	1,57 ± 0,1906	1,5 ± 0,19	1,478 ± 0,2232	1,592 ± 0,1855
T4 (nmol/l)	61 ± 5,097	69,32 ± 6,897 *	72,38 ± 2,753 **	81 ± 4,6 *** ++ #
T3/T4	0,025 ± 0,0019	0,024 ± 0,0078	0,021 ± 0,004	0,020 ± 0,0019
FT3 (pmol/l)	4,517 ± 0,8681	4,1 ± 0,97	4,04 ± 0,7021	4,42 ± 0,7396
FT4 (pmol/l)	30,63 ± 7,761	29,12 ± 2,219	31,54 ± 2,18	32,96 ± 4,928
Testosteron (ng/ml)	3,937 ± 2,722	4,212 ± 2,858	1,928 ± 0,436	2,766 ± 1,889

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (u poređenju sa kontrolom); ++ p<0,01 (u poređenju sa MIX 1); # p<0,05 (u poređenju sa MIX 2). Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, n = 5. MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + 0,09 x 10⁹ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + 0,18 x 10⁹

ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + 0,36 x 10⁹ ćelija/ml); T3: trijodotironin; T4: tiroksin; FT3: slobodni trijodotironin; FT4: slobodni tiroksin. SFN - sulforafan; PA-MSHA - inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Sprovedenom BMD analizom nije utvrđen dozni interval pouzdanosti ni za jedan od izmerenih hormona u serumu mužjaka pacova.

Kod ženki pacova tretiranih kombinacijom SFN i PA-MSHA nije uočena značajna razlika u nivou hormona u kontrolnoj i tretiranim grupama. Jedini, statistički značajan porast nivoa FT4, dobijen je u MIX 3 grupi u odnosu na kontrolu, ali ne i na druge 2 eksperimentalne grupe (Tabela 52). Dobijeni rezultati sugerisu različit odgovor mužjaka i ženki pacova na primenjenu kombinaciju imunomodulatora, i manju mogućnost promene nivoa tiroidnih hormona i testosterona kod ženki pacova.

Tabela 53. Uticaj kombinovane primene rastućih doza sulforafana i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na nivoe tiroidnih hormona i testosterona u serumu ženki pacova nakon 28 dana ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3
T3 (nmol/l)	1,427 ± 0,1941	1,514 ± 0,2065	1,55 ± 0,1435	1,596 ± 0,09529
T4 (nmol/l)	51,22 ± 10,14	52,94 ± 16,18	56,84 ± 11,44	66,04 ± 11,57
T3/T4	0,028 ± 0,0021	0,03 ± 0,0052	0,028 ± 0,0055	0,025 ± 0,0046
FT3 (pmol/l)	4,267 ± 0,8824	4,46 ± 0,7127	4,58 ± 0,4658	4,86 ± 0,5771
FT4 (pmol/l)	26,5 ± 3,94	30,38 ± 10,27	32,72 ± 7,32	34,92 ± 6,014 *
Testosteron (ng/ml)	0,04333 ± 0,0326	0,03 ± 0	0,038 ± 0,01789	0,03 ± 0

* p<0,05 (u poređenju sa kontrolom). Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, n = 5. MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + 0,09 x 10⁹ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + 0,18 x 10⁹ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + 0,36 x 10⁹ ćelija/ml); HDL: lipoprotein visoke gustine, LDL: lipoprotein niske gustine, AST: aspartat aminotransferaza, ALT: alanin aminotransferaza, TIBC: totalni kapacitet vezivanja gvožđa, UIBC: nezasićeni (slobodni) kapacitet vezivanja gvožđa. SFN - sulforafan; PA-MSHA - inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Kao i kod mužjaka tretiranih kombinacijom SFN i PA-MSHA, sprovedenom BMD analizom nije dobijen ni jedan dozni interval pouzdanosti za hormone izmerene u serumu ženki pacova.

4.3.2.7. Uticaj na produkciju proteina

4.3.2.7.1. Sulforafan

Značajno povećanje nivoa IL-10 uočeno je samo u plazmi životinja u grupi SFN 2 u odnosu na kontrolu i SFN 1 (p<0,01). IL-10 u SFN 3 grupi bio je značajno niži u odnosu na SFN 2, pri čemu je p vrednost manja od 0,05. Dodatno, sniženi nivoi interleukina 2 i 6 u plazmi tretiranih pacova u grupama SFN 2 i SFN 3 u odnosu na SFN 1 ukazuju na njihovu smanjenu produkciju, pri čemu je nivo IL-6 bio statistički značajno niži u SFN 2 grupi i u odnosu na kontrolu. Nivoi TNFα, HO-1 i Nrf2 mereni su u homogenatu tkiva jetre tretiranih pacova, obzirom da jetra predstavlja jedan od organa sa najvišom ekspresijom datih faktora (141), dok je koncentracija CXCL1 i TGFβ određena u homogenatu tkiva pluća. Dobijeni rezultati pokazuju da je nivo HO-1 povišen pod dejstvom SFN u grupama

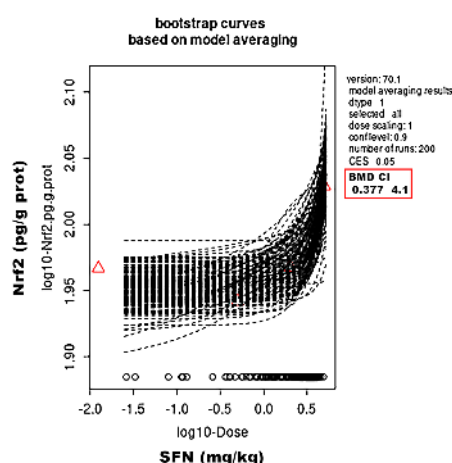
SFN 1 i SFN 3 u odnosu na kontrolu, a snižen u grupi SFN 2 u odnosu na SFN 1. S druge strane, produkcija Nrf2 u jetri mužjaka pacova bila je značajno povećana u grupi SFN 3 u odnosu na kontrolu i SFN 1 grupu ($p < 0,05$). SFN tretman nije uticao na produkciju ostalih proteina izmerenih u ovoj doktorskoj disertaciji (Tabela 54).

Tabela 54. Uticaj rastućih doza sulforafana na produkciju proteina kod mužjaka pacova nakon oralne subakutne ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	SFN 1	SFN 2	SFN 3
CXCL1 (g/proteina pluća)	33,99 ± 12,73	45,88 ± 12,81	32,46 ± 8,536	39,05 ± 5,329
HO-1 (pg/g proteina jetre)	1,794 ± 0,3423	2,189 ± 0,2898 *	1,685 ± 0,051 +	1,937 ± 0,2525
IFNγ (pg/ml)	29,34 ± 14,32	42,86 ± 24,17	26,78 ± 22,22	32,35 ± 27,33
IL-2 (pg/ml)	44,59 ± 25,45	67,52 ± 8,094	34,87 ± 6,841 +	47,33 ± 14,98
IL-6 (pg/ml)	227 ± 96,71	269,8 ± 36,95	101,9 ± 49,61 * ++	163,5 ± 71,72 +
IL-10 (pg/ml)	5,858 ± 3,76	7,151 ± 4,443	21,9 ± 12,9 ** ++	9,737 ± 3,726 #
Nrf2 (pg/g proteina jetre)	93,13 ± 10,99	87,97 ± 11,12	92,86 ± 2,134	107,3 ± 10,68 * +
TGFβ (g/proteina pluća)	26,07 ± 11,53	33,72 ± 8,101	23,46 ± 7,88	33,4 ± 10,36
TNFα (pg/g proteina jetre)	27,77 ± 5,833	26,32 ± 2,992	27,41 ± 1,065	29,97 ± 4,342

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (u poređenju sa kontrolom); + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ (u poređenju sa SFN 1); # $p < 0,05$ (u poređenju sa SFN 2); Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference, LSD*). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije. SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m/dan); SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m/dan); SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m/dan); CXCL1: hemiokin ligand 1; HO-1: hem oksigenaza; IFN γ : interferon-gama; IL-2: interleukin 2; IL-6: interleukin 6; IL-10: interleukin 10; Nrf2: nuklearni faktor 2 sličan eritroidu; TGF β : transformirajući faktor rasta beta; TNF α : faktor nekroze tumora alfa

U cilju razumevanja odnosa primenjene doze SFN i promena u produkciji analiziranih proteina sprovedenom BMD analizom izračunat je dozni interval pouzdanosti za Nrf2 kod koga je BMDL iznosila 0,377 mg/kg t.m./dan SFN. Promene uočene u produkciji ostalih izmerenih proteina nisu pokazale doznu zavisnost (Slika 37).



Slika 37. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih doza sulforafana i koncentracije Nrf2 kod mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije

SFN (0,5, 2 i 5 mg/kg t.m/dan); Broj iteracija: 200. Nrf2: nuklearni faktor 2 sličan eritroidu; SFN: sulforafan

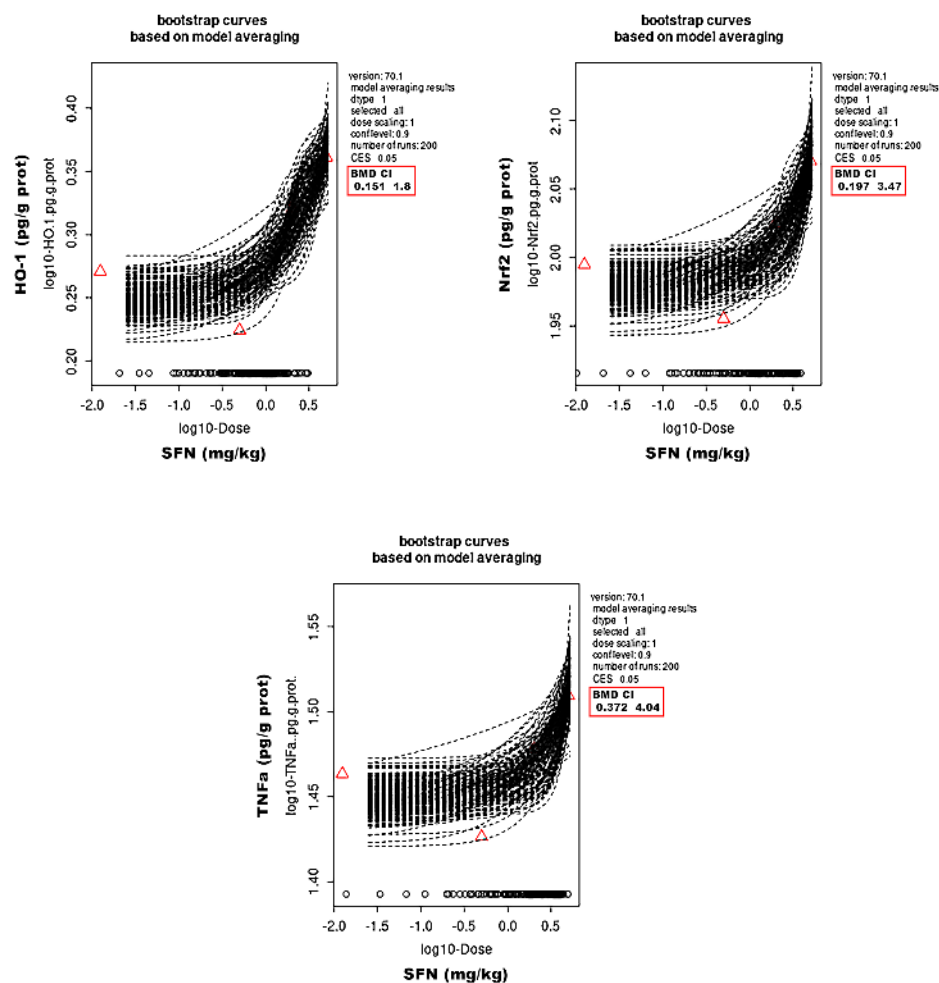
Tretman rastućim dozama SFN uticao je na produkciju odabranih proteina kod ženki pacova što je prikazano u Tabeli 55. Nakon 28 dana tretmana izmerena koncentracija HO-1 u homogenatu tkiva jetre bila je viša u SFN 2 i SFN 3 grupi u odnosu na kontrolu i SFN 1. Dodatno, produkcija HO-1 u SFN 3 u odnosu na SFN 2 bila je statistički značajno viša. Posledično, nivo Nrf2 bio je viši u SFN 2 i SFN 3 grupi u odnosu na kontrolu i SFN 1. Efekat SFN na produkciju Nrf2 bio je najizraženiji u SFN 3 grupi gde je koncentracija ovog faktora bila viša u odnosu na SFN 2 grupu. Porast nivoa TNF α bio je dozno-zavistan, odnosno najviše koncentracije TNF α izmerene su u SFN 3 grupi, značajno više u odnosu na kontrolu i SFN 1 grupu. Konačno, razlika između kontrole i eksperimentalnih grupa u produkciji interleukina uočena je samo za IL-2. Nivo IL-2 bio je statistički značajno niži u SFN 1 grupi u odnosu na kontrolu. U SFN 2 grupu koncentracija IL-2 značajno je viša u odnosu na SFN 1.

Tabela 55. Uticaj rastućih doza sulforafana na produkciju proteina kod ženki pacova nakon oralne subakutne ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	SFN 1	SFN 2	SFN 3
CXCL1 (g/proteina pluća)	40,22 $\pm$ 12,35	41,19 $\pm$ 14,31	46,97 $\pm$ 7,79	37,2 $\pm$ 17,46
HO-1 (pg/g proteina jetre)	1,87 $\pm$ 0,15	1,68 $\pm$ 0,09	2,1 $\pm$ 0,082 * ++	2,3 $\pm$ 0,2 *** ++++#
IFNγ (pg/ml)	67,71 $\pm$ 39,18	109,7 $\pm$ 75,33	230,8 $\pm$ 125,5	128,2 $\pm$ 97,79
IL-2 (pg/ml)	57,08 $\pm$ 16,29	10,38 $\pm$ 6,9 **	67,08 $\pm$ 22,89 ++	39,04 $\pm$ 14,5
IL-6 (pg/ml)	138,7 $\pm$ 24,4	181,9 $\pm$ 109,1	202,7 $\pm$ 64,95	99,39 $\pm$ 31,66
IL-10 (pg/ml)	19,05 $\pm$ 7,129	17,62 $\pm$ 6,422	11,53 $\pm$ 4,459	13,37 $\pm$ 5,623
Nrf2 (pg/g proteina jetre)	99,14 $\pm$ 8,863	90,41 $\pm$ 6,904	106 $\pm$ 2,5 +	118 $\pm$ 11,1 ** +++#
TGFβ (pg/g proteina pluća)	27,16 $\pm$ 8,137	26,93 $\pm$ 10,9	34,3 $\pm$ 6,936	27,28 $\pm$ 12,16
TNFα (pg/g proteina jetre)	29,1 $\pm$ 1,529	26,72 $\pm$ 1,379	30,11 $\pm$ 1,8 +	32,4 $\pm$ 2,3 ** +++

* p<0,05; *** p<0,001 (u poređenju sa kontrolom); + p<0,05; ++ p<0,01; +++ p<0,001; ++++ p<0,0001 (u poređenju sa SFN 1); # p<0,05 (u poređenju sa SFN 2); Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti $\pm$ standardne devijacije. SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m./dan); SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m./dan); SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m./dan); CXCL1: hemiokin ligand 1; HO-1: hem oksigenaza; IFN γ : interferon-gama; IL-2: interleukin 2; IL-6: interleukin 6; IL-10: interleukin 10; Nrf2: nuklearni faktor 2 sličan eritroidu; TGF β : transformirajući faktor rasta beta; TNF α : faktor nekroze tumora alfa

Analizom odnosa doza-odgovor (BMD analiza, PROAST softver) izračunati su BMDU/BMDL intervali za HO-1, Nrf2 i TNF α . Svi dobijeni intervali bili su uski što ukazuje na visok nivo pouzdanosti rezultata. BMDL vrednost za HO-1, odnosno najniža koncentracija SFN koja može dovesti do 5% povećanja produkcije HO-1 u jetri tretiranih ženki pacova iznosi 0,151 mg/kg t.m./dan, dok je za Nrf2 i TNF α ta vrednost 0,197 mg/kg t.m./dan i 0,372 mg/kg t.m./dan, redom (Slika 38).



Slika 38. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih doza sulforafana i koncentracija HO-1, Nrf2 i TNFα kod ženki pacova nakon 28 dana ekspozicije

SFN (0,5, 2 i 5 mg/kg t.m/dan); Broj iteracija: 200. HO-1: hem oksigenaza 1; Nrf2: nuklearni faktor 2 sličan eritroidu; TNFα: faktor nekroze tumora alfa. SFN: sulforafan

4.3.2.7.2. Inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Produkcija proteina kod mužjaka pacova bila je izmenjena i nakon tretmana rastućim dozama PA-MSHA, pri čemu je značajno povećanje u odnosu na kontrolu dobijeno za IL-10 i TGFβ. Sa porastom primenjene doze PA-MSHA rasla je produkcija pomenutih proteina. Nivo IL-10 i TGFβ bio je statistički značajno viši u PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 grupi u odnosu na kontrolu i PA-MSHA 1. Pored toga, uočen je porast nivoa IFNγ i IL-2 u PA-MSHA 3 grupi u odnosu na kontrolu (Tabela 56).

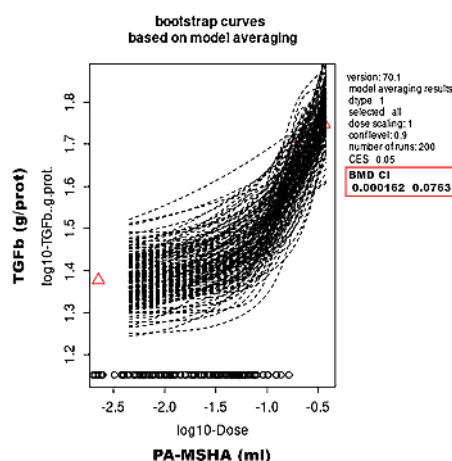
Tabela 56. Uticaj rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na produkciju proteina kod mužjaka pacova nakon subkutane subakutne ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	PA-MSHA 1	PA-MSHA 2	PA-MSHA 3
CXCL1 (pg/g proteina pluća)	33,99 ± 12,73	34,82 ± 4,551	44,55 ± 23,56	38,48 ± 8,088
HO-1 (pg/g proteina jetre)	1,794 ± 0,3423	1,741 ± 0,3726	2,015 ± 0,1856	1,943 ± 0,3529
IFNγ (pg/ml)	29,34 ± 14,32	103,4 ± 44,07	89,84 ± 14,1	138 ± 75,44 *
IL-2 (pg/ml)	44,59 ± 25,45	50,71 ± 9,749	10,1 ± 12,76	84,26 ± 27,64 *

IL-6 (pg/ml)	227 ± 96,71	302,6 ± 90,82	142,2 ± 25,02	253,9 ± 85,78
IL-10 (pg/ml)	5,858 ± 3,76	9,914 ± 5,827	33,14 ± 9,3 ** +	49 ± 19,1 **** +++
Nrf2 (pg/g proteina jetre)	93,13 ± 10,99	94,93 ± 18	111,7 ± 6,89	107,7 ± 16,1
TGFβ (pg/g proteina pluća)	26,07 ± 11,53	28,68 ± 6,202	50,73 ± 16 ** +	56,7 ± 10,1 *** ++
TNFα (pg/g proteina jetre)	27,77 ± 5,833	29,4 ± 5,062	29,76 ± 1,142	32,46 ± 4,792

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001 (u poređenju sa kontrolom); + p<0,05; ++ p<0,01; +++ p<0,001 (u poređenju sa PA-MSHA 1). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije. PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,09 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,18 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,36 x 10⁹ ćelija/ml); CXCL1: hemiokin ligand 1; HO-1: hem oksigenaza; IFNG: interferon-gama; IL-2: interleukin 2; IL-6: interleukin 6; IL-10: interleukin 10; Nrf2: nuklearni faktor 2 sličan eritroidu; TGFβ: transformirajući faktor rasta beta; TNFα: faktor nekroze tumora alfa

Benčmark analizom ispitan je dozno-zavisni odgovor između primenjene doze PA-MSHA i promena u nivou ispitivanih proteina. Kao što je prikazano na Slici 39, uočen je dozno-zavisan efekat samo između primenjene doze PA-MSHA i nivoa TGFβ koji prati pozitivan odnos (Slika 39).



Slika 39. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i koncentracije TGFβ kod mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije

PA-MSHA (0,09 x 10⁹ ćelija/ml; 0,18 x 10⁹ ćelija/ml; 0,36 x 10⁹ ćelija/ml); Broj iteracija: 200. TGFβ; transformišući faktor rasta beta. PA-MSHA: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

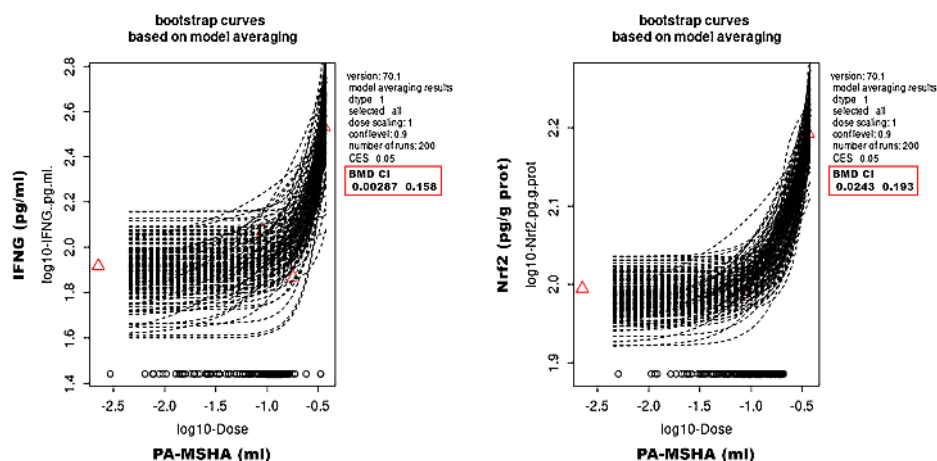
Produkcija IFNγ i IL-2 bila je značajno izmenjena pod dejstvom PA-MSHA kada je primenjivan u najvišoj ispitivanoj dozi (PA-MSHA 3). Izmereni nivoi pomenutih citokina u plazmi pacova PA-MSHA 3 grupe bili su viši u odnosu na kontrolu, ali i PA-MSHA 1 i PA-MSHA 2 grupu. Sličan trend uočen je i za Nrf2 i TGFβ, čija je koncentracija bila najviša u PA-MSHA 3 grupi, značajno viša u odnosu na kontrolu i ostale eksperimentalne grupe (PA-MSHA 1 i PA-MSHA 2). Dodatno, poređenjem svih grupa međusobno, uočena je značajna razlika u nivou IL-10 u PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 grupi u odnosu na PA-MSHA 1 (p<0,01) (Tabela 57).

Tabela 57. Uticaj rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na produkciju proteina kod ženki pacova nakon subakutne ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	PA-MSHA 1	PA-MSHA 2	PA-MSHA 3
CXCL1 (pg/g proteina pluća)	40,22 ± 12,35	36,78 ± 6,167	40,26 ± 19,84	43,47 ± 13,5
HO-1 (pg/g proteina jetre)	1,871 ± 0,1528	1,743 ± 0,2123	2,009 ± 0,4802	2,03 ± 0,5443
IFNγ (pg/ml)	67,71 ± 39,18	109,9 ± 42,24	104,5 ± 48,24	421 ± 122,3 * + ##
IL-2 (pg/ml)	57,08 ± 16,29	55,29 ± 31,74	49,40 ± 17,93	98,5 ± 35,8 * + #
IL-6 (pg/ml)	138,7 ± 24,4	179,9 ± 82,57	223,3 ± 75,52	247,5 ± 122
IL-10 (pg/ml)	19,05 ± 7,129	7,349 ± 3,191	29,2 ± 9,465 ++	43,99 ± 15,58 ++
Nrf2 (pg/g proteina jetre)	99,14 ± 8,863	97,44 ± 14,82	117,4 ± 22,4	158 ± 27 *** +++##
TGFβ (pg/g proteina pluća)	27,16 ± 8,137	39,08 ± 2,91	48,65 ± 18,42	85 ± 12 *** ++ #
TNFα (pg/g proteina jetre)	29,1 ± 1,529	28,24 ± 3,875	29 ± 4,727	32,03 ± 4,761

* p<0,05; *** p<0,001 (u poređenju sa kontrolom); + p<0,05; ++ p<0,01; +++ p<0,001 (u poređenju sa PA-MSHA 1); # p<0,05; ## p<0,01 (u poređenju sa PA-MSHA 2); Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije. PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,09 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,18 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,36 x 10⁹ ćelija/ml); CXCL1: hemiokin ligand 1; HO-1: hem oksigenaza; IFN γ : interferon-gama; IL-2: interleukin 2; IL-6: interleukin 6; IL-10: interleukin 10; Nrf2: nuklearni faktor 2 sličan eritroidu; TGF β : transformišući faktor rasta beta; TNF α : faktor nekroze tumora alfa

Uticaj primenjene doze PA-MSHA na promenu nivoa proteina u plazmi, odnosno tkivima jetre i pluća ženki pacova, ispitan je *Benchmark* analizom. Primenjena doza PA-MSHA pozitivno korelira sa nivoom IFN γ , IL-10 i TGF β , ali su izmerene BMDL vrednosti za IFN γ i IL-10 kod ženki više u odnosu na vrednosti kod mužjaka pacova. Pored toga izračunati BMDU/BMDL odnosi pokazuju da jedino intervali za IFN γ i Nrf2 zadovoljavaju postavljene kriterijume, odnosno postojanje veze između primenjene doze i odgovora. Primena PA-MSHA u dozi od 0,00287 x 10⁹ ćelija/ml, odnosno 0,0243 x 10⁹ ćelija/ml može dovesti do 5% povećanja nivoa IFN γ i Nrf2 kod tretiranih pacova, redom (Slika 40).



Slika 40. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i koncentracija IFN γ i Nrf2 kod ženki pacova nakon 28 dana ekspozicije

PA-MSHA (0,09 x 10⁹ ćelija/ml; 0,18 x 10⁹ ćelija/ml; 0,36 x 10⁹ ćelija/ml); Broj iteracija: 200. IFNG: interferon gama; Nrf2: nuklearni faktor 2 sličan eritroidu. PA-MSHA: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

4.3.2.7.3. Kombinovana primena imunomodulatora

Uticaj kombinovane primene SFN i PA-MSHA na produkciju proteina kod mužjaka pacova predstavljen je u Tabeli 58. Pri najnižoj primenjenoj dozi SFN i PA-MSHA (MIX 1) uočene se značajne promene u nivou CXCL1, IL-10 i TGFβ u odnosu na kontrolu, dok je u MIX 2 grupi zabeležen jedino statistički značajan porast IFNγ u odnosu na kontrolu. MIX 3 grupa razlikovala se od kontrolne u CXCL1 i IL-2 parametru. Dodatno, poređenjem eksperimentalnih grupa međusobno, uočen je značajno niži nivo CXCL1 i TGFβ u MIX 2 grupi u odnosu na MIX 1. U MIX 3 grupi zabeleženo je povećanje koncentracije CXCL1 i IL-6 u odnosu na MIX 2, ali ne i MIX 1.

Tabela 58. Uticaj kombinovane primene rastućih doza sulforafana i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na produkciju proteina kod mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3
CXCL1 (pg/g proteina pluća)	33,99 ± 12,73	51,77 ± 8,6 *	31,99 ± 4,083 ⁺	47,98 ± 10,1 * #
HO-1 (pg/g proteina jetre)	1,794 ± 0,3423	1,894 ± 0,1754	1,738 ± 0,2675	1,787 ± 0,1265
IFNγ (pg/ml)	32 ± 14,32	97,07 ± 34,42	166 ± 97,82 *	148,4 ± 70,69
IL-2 (pg/ml)	44,59 ± 25,45	67,28 ± 12,61	38,27 ± 6,697	85,87 ± 23,52 *
IL-6 (pg/ml)	227 ± 96,71	183,3 ± 50,98	168,6 ± 37,17	266,4 ± 51,97 #
IL-10 (pg/ml)	5,858 ± 3,76	19,52 ± 5,9 *	19,77 ± 14,07	14,58 ± 6,626
Nrf2 (pg/g proteina jetre)	93,13 ± 10,99	98,39 ± 9,108	102,7 ± 21,54	102,7 ± 7,28
TGFβ (pg/g proteina pluća)	26,07 ± 11,53	39,04 ± 2,054 *	20,18 ± 4,55 ⁺⁺	35,2 ± 3,04
TNFα (pg/g proteina jetre)	27,77 ± 5,833	28,85 ± 3,067	29,21 ± 4,51	27,54 ± 2,295

* p<0,05 (u poređenju sa kontrolom); + p<0,05; ++ p<0,01 (u poređenju sa MIX 1); # p<0,05 (u poređenju sa MIX 2). Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, n = 5. MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + 0,09 x 10⁹ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + 0,18 x 10⁹ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + 0,36 x 10⁹ ćelija/ml). CXCL1: hemiokin ligand 1; HO-1: hem oksigenaza; IFNγ: interferon-gama; IL-2: interleukin 2; IL-6: interleukin 6; IL-10: interleukin 10; Nrf2: nuklearni faktor 2 sličan eritroidu; TGFβ: transformirajući faktor rasta beta; TNFα: faktor nekroze tumora alfa. SFN - sulforafan; PA-MSHA - inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Sprovedena BMD analiza u cilju razjašnjenja odnosa primenjenih doza SFN i PA-MSHA i nivoa proteina u plazmi, odnosno tkivima mužjaka pacova nije utvrdila ni jedan dozni interval pouzdanosti za prethodno izmerene proteine.

Kod ženki pacova uočena je značajna promena u nivou IL-10 u sve 3 eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolu. Kod pacova tretiranih kombinacijom SFN i PA-MSHA produkcija ovog citokina bila je snižena u odnosu na kontrolu, ali se nije značajno razlikovala između MIX grupa. Pored toga, nivo TGFβ bio je viši u MIX 1 grupi, a IFNγ u MIX 2 grupi u odnosu na kontrolu. Koncentracija IFNG u MIX 2 bila je značajno viša i u odnosu na MIX 1 i MIX 3 grupu. Međutim, produkcija TNFa u MIX 2 grupi bila je niža nego u MIX 1, ali i MIX 3 ali bez statističke značajnosti (Tabela 59).

Tabela 59. Uticaj kombinovane primene rastućih doza sulforafana i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na produkciju proteina kod ženki pacova nakon 28 dana ekspozicije

Parametar (jedinica)	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3
CXCL1 (pg/g prot)	40,22 ± 12,35	48,62 ± 12,25	33,9 ± 2,751	42,24 ± 13,5
HO-1 (pg/g prot)	1,871 ± 0,528	1,95 ± 0,4262	1,63 ± 0,199	1,882 ± 0,1459
IFNγ (pg/ml)	67,71 ± 39,18	46 ± 33	140,3 ± 38 * ++	76 ± 39 #
IL-2 (pg/ml)	57,08 ± 16,29	75,93 ± 37,48	53,01 ± 28,03	127,9 ± 21,53
IL-6 (pg/ml)	138,7 ± 24,4	321,6 ± 113,9	279,6 ± 107,3	367,7 ± 187,1
IL-10 (pg/ml)	19,05 ± 7,129	9,947 ± 3,619 *	11,43 ± 5,655 *	9,526 ± 3,861 *
Nrf2 (pg/g prot)	99,14 ± 8,863	114,7 ± 26,74	93,9 ± 9,308	108 ± 14,49
TGFβ (pg/g prot)	27,16 ± 8,137	38,53 ± 5,436 *	34,22 ± 5,316	34,44 ± 6,622
TNFα (pg/g prot)	29,1 ± 1,529	33,27 ± 5,002	26,87 ± 3,187 +	29,39 ± 2,978

* p<0,05 (u poređenju sa kontrolom); + p<0,05; ++ p<0,01 (u poređenju sa MIX 1); # p<0,05 (u poređenju sa MIX 2). Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, n = 5. MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + 0,09 x 10⁹ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + 0,18 x 10⁹ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + 0,36 x 10⁹ ćelija/ml). CXCL1: hemiokin ligand 1; HO-1: hem oksigenaza; IFN γ : interferon-gama; IL-2: interleukin 2; IL-6: interleukin 6; IL-10: interleukin 10; Nrf2: nuklearni faktor 2 sličan eritroidu; TGF β : transformirajući faktor rasta beta; TNF α : faktor nekroze tumora alfa. SFN - sulforafan; PA-MSHA - inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Kao i kod mužjaka pacova, sprovedenom BMD analizom nije pronađen dozni interval pouzdanosti ni za jedan od izmerenih nivoa proteina u plazmi, odnosno tkivima ženki pacova.

4.3.2.8. Uticaj na parametre oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite

4.3.2.8.1. Sulforafan

Parametri oksidativnog stresa određeni su u plazmi mužjaka pacova i homogenatima tkiva bubrega, jetre, pluća, srca i timusa nakon izlaganja rastućim dozama SFN tokom 28 dana. U tabeli 60 prikazane su sve izmerene vrednosti i naznačene statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa i kontrole.

U plazmi mužjaka tretiranih pacova uočen je porast MDA vrednosti u SFN 2 grupi u odnosu na kontrolu, ali smanjenje u SFN 1 i SFN 3. Međutim, uočena razlika nije bila statistički značajna. Vrednosti IMA i SH bile su slične između kontrole i tretiranih grupa.

Dalje, u homogenatu tkiva bubrega najniža primenjena doza SFN (SFN 1) dovela je do statistički značajnog smanjenja nivoa SH i SOD (p<0,05). Koncentracija SH u SFN 2 i SFN 3 bila je, takođe, niža nego u kontroli, ali razlika nije bila značajna, dok je SOD u SFN 2 bio viši, a u SFN 3 niži u poređenju sa kontrolom.

Parametri oksidativnog stresa određeni u jetri ukazuju na smanjenje MDA u SFN 2 grupi, kao i smanjenje SOD u SFN 1 i SFN 3 grupi, ali ne i SFN 2. S druge strane, koncentracija IMA i SH ostala je nepromenjena nakon tretmana mužjaka pacova rastućim dozama SFN.

U homogenatu pluća primenjen tretman doveo je do značajnih promena u parametrima IMA, MDA i SOD. U poređenju sa kontrolom i SFN 1, u SFN 2 grupi došlo je povećanja nivoa IMA, dok je MDA bio značajno povišen u SFN 3 grupi u odnosu na sve ostale grupe. Konačno, aktivnost SOD bila je povišena u SFN 3 grupi u poređenju sa kontrolnom.

U homogenatu srca mužjaka pacova dobijen je porast IMA koncentracije u grupi pacova tretiranih najvišom dozom SFN (SFN 3) u odnosu na kontrolu i SFN 1 grupu ($p < 0,05$). Ni u jednom od ostalih ispitivanih parametara nije zabeležena statistički značajna razlika.

Na kraju, u homogenatu timusa, uočeno je značajno smanjenje u nivou IMA u SFN 1 i SFN 2 grupi u odnosu na kontrolu, bez razlika u ostalim izmerenim parametrima oksidativnog stresa.

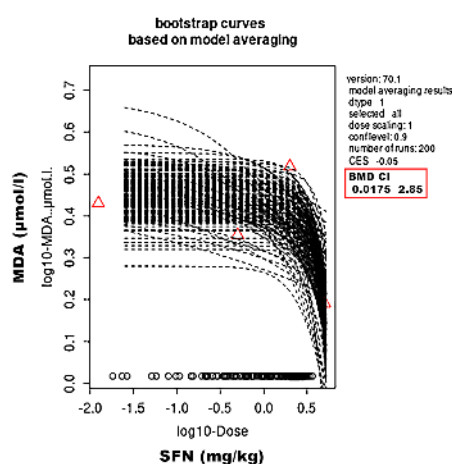
Tabela 60. Uticaj rastućih doza sulforafana na parametre oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite u plazmi i tkivima pacova nakon oralne subakutne ekspozicije mužjaka pacova

Uzorak	Parametar (jed.)	Kontrola	SFN 1	SFN 2	SFN 3
Plazma	IMA (ng/L)	23,62 ± 3,39	23,74 ± 2,32	25,33 ± 1,61	23,86 ± 3,601
	MDA (μmol/L)	2,732 ± 0,5288	2,407 ± 1,048	3,5 ± 1,335	1,704 ± 0,8909
	SH (mmol/L)	0,9379 ± 0,2267	1,139 ± 0,1177	1,03 ± 0,0925	1,096 ± 0,2534
Bubreg	GSH (μmol/g prot)	775 ± 307	436 ± 253	537 ± 295	598 ± 281
	IMA (ng/g prot)	239,1 ± 64,38	185,6 ± 56,67	239,6 ± 46,75	259,3 ± 103,1
	MDA (μmol/g prot)	77,74 ± 0,9322	77,06 ± 0,6993	77,21 ± 0,6339	76,97 ± 0,9331
	SH (mmol/g prot)	17,14 ± 6,206	9,145 ± 4,55 *	14,95 ± 2,304	14,1 ± 4,678
	SOD (U/g prot)	75 ± 13	41 ± 14 *	83 ± 34 ⁺	69 ± 32
Jetra	IMA (ng/g prot)	28,39 ± 6,913	23,5 ± 3,791	30,58 ± 2,839	23,86 ± 5,647
	MDA (μmol/g prot)	0,94 ± 0,41	0,65 ± 0,13	0,64 ± 0,13 *	0,76 ± 0,12
	SH (mmol/g prot)	0,555 ± 0,1658	0,4116 ± 0,09746	0,5208 ± 0,05722	0,4313 ± 0,09335
	SOD (U/g prot)	2,725 ± 0,381	1,85 ± 0,59 *	2,359 ± 0,4007	1,76 ± 0,642 ***
Pluća	GSH (μmol/g prot)	2,278 ± 0,7543	3,279 ± 1,241	2,385 ± 1,53	3,665 ± 1,942
	IMA (ng/g prot)	6,656 ± 0,6748	7,666 ± 2,199	9,6 ± 0,514 ** ⁺	8,304 ± 1,217
	MDA (μmol/g prot)	0,84 ± 0,12	1 ± 0,28	1 ± 0,049	1,6 ± 0,4 *** ^{++ ##}
	SOD (U/g prot)	0,7157 ± 0,1223	1,039 ± 0,4858	1,564 ± 0,7755	1,486 ± 0,2641 **
Srce	GSH (μmol/g prot)	6,097 ± 0,6928	7,33 ± 1,705	6,636 ± 1,063	7,174 ± 0,9372
	IMA (ng/g prot)	8,947 ± 0,406	8,802 ± 0,6816	9,204 ± 1,202	10,12 ± 1,19 * ⁺
	MDA (μmol/g prot)	1,8 ± 0,56	1,7 ± 0,47	1,6 ± 0,52	1,6 ± 0,32
	SOD (U/g prot)	1,225 ± 0,402	1,52 ± 0,3063	1,051 ± 0,0594	1,177 ± 0,4462
Timus	GSH (μmol/g prot)	5,971 ± 1,358	5,194 ± 0,6289	5,244 ± 3,05	5,32 ± 1,282
	IMA (ng/g prot)	13,43 ± 2,907	10,14 ± 1,359 *	10,6 ± 1,479 *	12,19 ± 1,102
	MDA (μmol/g prot)	1,3 ± 0,8	1,1 ± 0,32	1 ± 0,6	1,2 ± 0,16
	SOD (U/g prot)	1,083 ± 0,2521	0,8413 ± 0,3102	0,9721 ± 0,516	0,633 ± 0,3732

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (u odnosu na kontrolu); + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$ (u poređenju sa SFN 1); ## $p < 0,01$ (u poređenju sa SFN 2). Kontrola: kukuruzno ulje; SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m./dan); SFN 2:

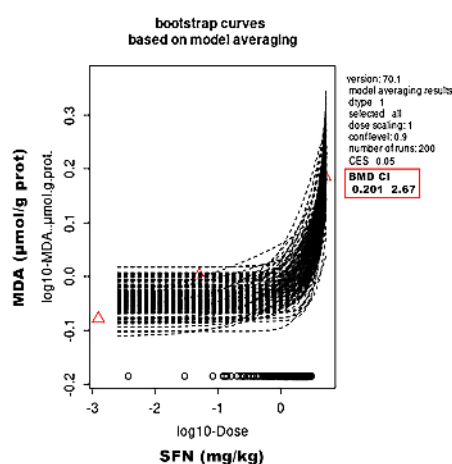
sulforafan (2 mg/kg t.m./dan); SNF 3: sulforafan (5 mg/kg t.m./dan). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). IMA: ishemjom modifikovani albumin; MDA: malondialdehid; SH: ukupne sulfhidrilne grupe; GSH: glutation; SOD: super oksid dismutaza

Za svaki od izmerenih parametara oksidativnog stresa u plazmi i homogenatima tkiva mužjaka pacova sprovedena je *Benchmark* analiza u cilju boljeg razumevanja odnosa doza-odgovor, a dobijeni grafici prikazani su na slikama 41-43. U plazmi pacova uočen je dozno-zavistan odgovor između koncentracije MDA i primenjene doze SFN pri čemu je BMDL iznosila 0,0175 mg/kg t.m./dan. U homogenatu tkiva pluća uočena je pozitivna korelacija između primenjene doze SFN i koncentracije MDA. Takođe, ushodni trend krive uočen je i u homogenatu srca pacova između SFN i IMA.



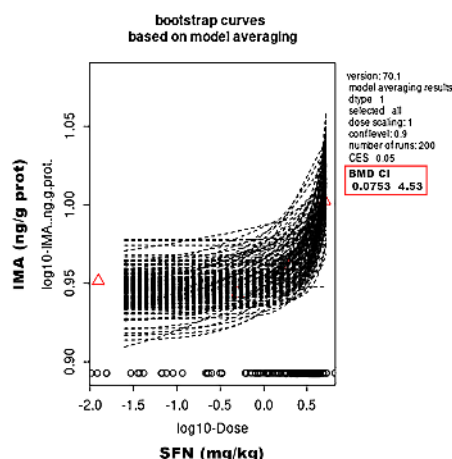
Slika 41. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih doza sulforafana i koncentracije MDA u plazmi mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije

MDA: malondialdehid; SFN (0,5, 2 i 5 mg/kg t.m./dan); Broj iteracija: 200. SFN: sulforafan



Slika 42. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih doza sulforafana i koncentracije MDA u plućima mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije

MDA: malondialdehid; SFN (0,5, 2 i 5 mg/kg t.m./dan); Broj iteracija: 200. SFN: sulforafan



Slika 43. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih doza sulforafana i koncentracije IMA u srcu mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije

IMA: ishemijom modifikovan albumin; SFN (0,5, 2 i 5 mg/kg t.m/dan); Broj iteracija: 200. SFN: sulforafan

Parametri oksidativnog stresa određeni su u plazmi ženki pacova i homogenatima tkiva bubrega, jetre, pluća, srca, i timusa nakon izlaganja rastućim dozama SFN tokom 28 dana, na isti način kao i kod mužjaka u cilju razumevanja polno-specifičnog odgovora. Rezultati su prikazani tabelarno, u Tabeli 61.

U plazmi ženki tretiranih pacova uočen je porast MDA vrednosti u svim tretiranim grupama, pri čemu je efekat bio najizraženiji u SFN 1 grupi u odnosu na kontrolu. Razlika je uočena i između SFN 1 i SFN 2 grupe, u kojoj je nivo MDA bio značajno niži. Vrednosti IMA bile su niže u eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolu, ali je jedino značajno smanjenje zabeleženo u grupi SFN 1 u odnosu na kontrolu.

Dalje, u homogenatu tkiva bubrega uočene su razlike u svim određivanim parametrima oksidativnog stresa. Nivo GSH, IMA i SOD bio je značajno viši u SFN 3 grupi u odnosu na kontrolnu, ali i SFN 1 i SFN 2 grupu. Takođe, SH grupe bile su više u SFN 3 grupi u odnosu na kontrolu i SFN 2, dok je MDA parametar bio značajno niži u SFN 1 grupi u odnosu na sve ostale grupe.

U homogenatu tkiva jetre ženki pacova, značajno smanjenje nivoa ukupnih SH grupa i aktivnosti SOD uočen je u SFN 3 grupi u odnosu na SFN 1 dok se ostali parametri nisu statistički značajno razlikovali od kontrole.

Dalje, primenjen tretman doveo je do značajnog smanjenja koncentracije GSH u homogenatu tkiva pluća ženki pacova u SFN 3 grupi ($p < 0,05$). Pored toga, smanjenje MDA dobijeno je u SFN 2 grupi u poređenju sa kontrolom. Između eksperimentalnih grupa nije uočena značajna razlika.

U homogenatu srca ženki pacova primećeno je značajno smanjenje nivoa MDA samo u SFN 1 grupi, dok su ostali parametri oksidativnog stresa u srcu bili neizmenjeni nakon tretmana.

Na kraju, u homogenatu tkiva timusa ženki pacova nije uočena ni jedna promena u izmerenim parametrima oksidativnog stresa između kontrole i eksperimentalnih grupa.

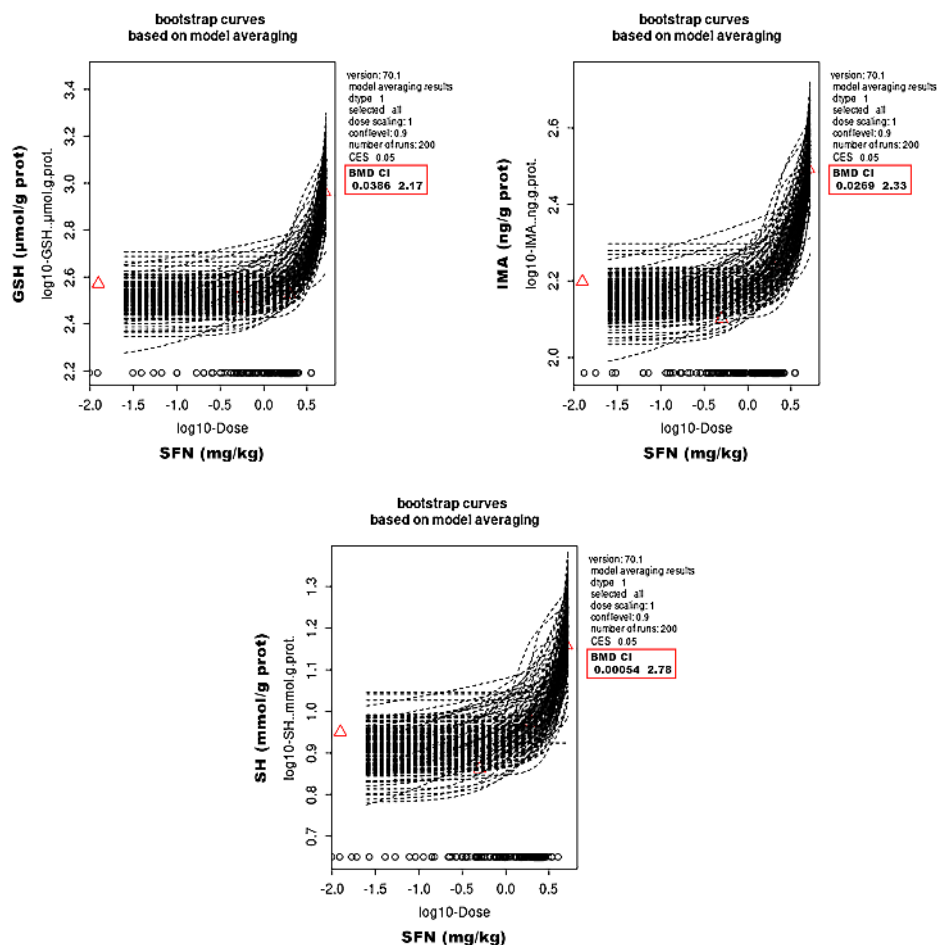
Tabela 61. Uticaj rastućih doza sulforafana na parametre oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite nakon oralne subakutne ekspozicije ženki pacova

Uzorak	Parametar (jed.)	Kontrola	SFN 1	SFN 2	SFN 3
Plazma	IMA (ng/L)	26,17 ± 1,951	21,6 ± 3,322 *	25,07 ± 4,288	23 ± 2,61
	MDA (μmol/L)	1,599 ± 0,6408	3,3 ± 0,7 ***	2,315 ± 0,74 +	2,77 ± 0,3378 **
	SH (mmol/L)	1,199 ± 0,339	0,998 ± 0,08181	1,321 ± 0,7079	1,01 ± 0,4219
Bubreg	GSH (μmol/g prot)	394 ± 155	338 ± 116	365 ± 157	765 ± 357 * + #
	IMA (ng/g prot)	162,9 ± 47,15	132,5 ± 46,3	186 ± 77,14	327 ± 122 ** + #
	MDA (μmol/g prot)	76 ± 0,45	59,27 ± 21,24 *	76,91 ± 0,845 +	78,57 ± 1,054 ##
	SH (mmol/g prot)	9,132 ± 2,285	7,834 ± 3,38	10,42 ± 4,952	14,86 ± 4,423 * #
	SOD (U/g prot)	39 ± 17	41 ± 11	60 ± 29	99 ± 44 ** + #
Jetra	IMA (ng/g prot)	30,36 ± 1,268	30,09 ± 2,313	28,5 ± 4,271	28,43 ± 3,921
	MDA (μmol/g prot)	1,1 ± 0,34	0,98 ± 0,082	1,3 ± 0,27	1 ± 0,26
	SH (mmol/g prot)	0,3949 ± 0,07736	0,465 ± 0,065	0,3528 ± 0,052	0,313 ± 0,14 #
	SOD (U/g prot)	2,53 ± 0,3628	3,155 ± 0,5617	2,562 ± 0,6275	2,106 ± 0,3511 ##
Pluća	GSH (μmol/g prot)	3,4 ± 2,2	1,8 ± 1,8	1,6 ± 0,56	0,96 ± 0,22 *
	IMA (ng/g prot)	7,753 ± 1,093	7,947 ± 0,2743	7,303 ± 1,787	7,108 ± 1,475
	MDA (μmol/g prot)	1,3 1,1 - 3,4	1,0 0,98 - 1,3	0,78 ** 0,72 - 1,8	1,0 0,77 - 1,9
	SOD (U/g prot)	1,065 ± 0,2869	0,8679 ± 0,2913	0,9672 ± 0,3925	0,7779 ± 0,1677
Srce	GSH (μmol/g prot)	7,22 ± 1,073	8,414 ± 1,704	7,939 ± 2,315	10,13 ± 3,834
	IMA (ng/g prot)	9,637 ± 1,569	9,089 ± 1,763	10,4 ± 0,7081	9,156 ± 1,328
	MDA (μmol/g prot)	2,1 ± 1,3	0,95 ± 0,25 *	1,5 ± 0,23	1,6 ± 1
	SOD (U/g prot)	1,541 ± 0,3261	1,604 ± 0,822	2,325 ± 1,137	1,6 ± 0,6055
Timus	GSH (μmol/g prot)	6,544 ± 1,822	7,278 ± 2,045	5,079 ± 1,812	6,537 ± 1,278
	IMA (ng/g prot)	9,962 ± 2,566	10,44 ± 1,161	9,095 ± 0,7067	9,626 ± 0,7823
	MDA (μmol/g prot)	1,1 ± 0,34	1,2 ± 0,32	0,94 ± 0,38	0,95 ± 0,11
	SOD (U/g prot)	0,6749 ± 0,4634	0,6295 ± 0,4818	0,6827 ± 0,1224	0,8587 ± 0,3237

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (u odnosu na kontrolu); + p<0,05; ++ p<0,01 (u poređenju sa SFN 1); #p<0,05; ## p<0,01 (u poređenju sa SFN 2). Kontrola: kukuruzno ulje; SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m./dan); SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m./dan); SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m./dan). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD)/Neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test. IMA: ishemijski modifikovani albumin; MDA: malondialdehid; SH: ukupne sulfhidrilne grupe; GSH: glutation; SOD: superoksid dismutaza

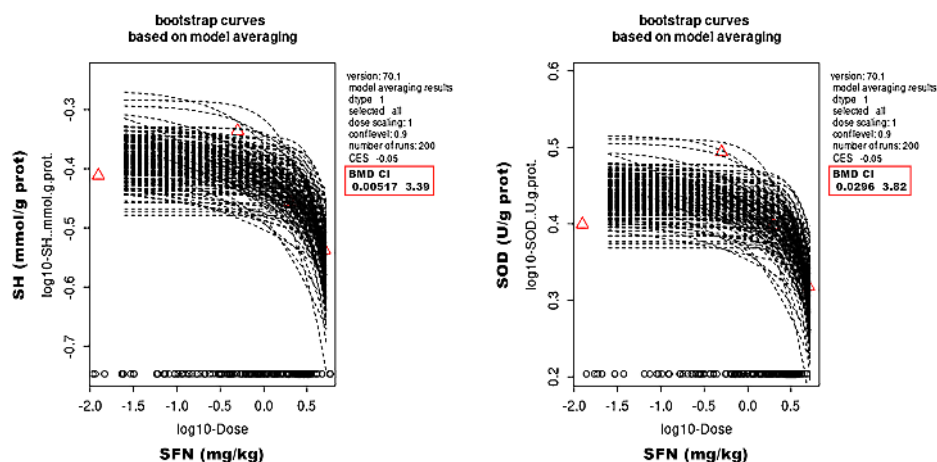
Analiza odnosa doza-odgovor sprovedena je za svaki od izmerenih parametara oksidativnog statusa kod ženki u odnosu na primenjene doze SFN. Kao i kod mužjaka pacova, koncentracija MDA u plazmi ženki pacova zavisila je od primenjene doze SFN. Međutim, dok kod mužjaka primena SFN dovodi do smanjenj nivoa MDA, kod ženki SFN povećava se uočava trend rasta, ali bez potvrđene dozno-zavisnosti. Primena SFN kod ženki pacova dovodi do dozno-zavisnog povećanja parametara oksidativnog stresa u bubrezima i to: GSH, IMA i SH. Na slici 44 prikazani su grafici i BDMU/BMDL intervali za svaki od pomenutih parametara. Dobijeni intervali za GSH i IMA bili su uži od

intervala za SH i SOD što ukazuje na veću pouzdanost dobijenih rezultata. Uočava se da kod mužjaka pacova nisu dobijene promene u parametrima oksidativnog stresa u homogenatu tkiva bubrega, za razliku od ženki pacova (Slika 45).



Slika 44. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih doza sulforafana i koncentracije GSH, IMA i SH u bubrezima ženki pacova nakon 28 dana ekspozicije

GSH: glutation, IMA: ishemijom modifikovan albumin, SH: ukupne sulfhidrilne grupe; SFN (0,5, 2 i 5 mg/kg t.m/dan); Broj iteracija: 200. SFN: sulforafan



Slika 45. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih doza sulforafana i koncentracija SH i SOD u jetri ženki pacova nakon 28 dana ekspozicije

SH: ukupne sulfhidrilne grupe, SOD: superoksid dismutaza; SFN (0,5, 2 i 5 mg/kg t.m/dan); Broj iteracija: 200. SFN: sulforafan

4.3.2.8.2. Inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Mušjaci pacova tretirani rastućim dozama PA-MSHA jednom nedeljno tokom četiri nedelje, žrtvovani su nakon 28 dana, nakon čega su određeni parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi i homogenatima tkiva bubrega, jetre, pluća, srca i timusa. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 62.

U plazmi pacova, primena najviše doze PA-MSHA (PA-MSHA 3) dovela je do statistički značajnog smanjenja nivoa SH grupa u odnosu na kontrolu. Takođe, uočeno je i smanjenje nivoa IMA i MDA u PA-MSHA 3 grupi, ali nije bilo značajno u odnosu na kontrolu, već samo u odnosu na PA-MSHA 1. Pored toga, niža koncentracija IMA dobijena je u i PA-MSHA 2 grupi (u odnosu na PA-MSHA 1). Značajan porast MDA uočen je samo u PA-MSHA 2 grupi i to u odnosu na kontrolnu i druge 2 eksperimentalne grupe.

U homogenatu bubrega mužjaka pacova jedina statistički značajna razlika dobijena je u IMA parametru: porast nivoa u PA-MSHA 1 grupi u odnosu na kontrolu i smanjenje u PA-MSHA 3 grupi u odnosu na PA-MSHA 1.

U homogenatu jetre mužjaka pacova tretiranih najvišom dozom PA-MSHA (PA-MSHA 3) izmerene su značajno više vrednosti MDA u odnosu na kontrolu i PA-MSHA 1 grupu, a niže vrednosti SH u odnosu na kontrolnu grupu.

PA-MSHA tretman doveo je do smanjenja nivoa GSH u plućima mužjaka pacova u grupama PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 u poređenju sa kontrolom. Dalje, vrednosti IMA bile su više u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolnu, ali je najznačajnije povećanje dobijeno u grupi PA-MSHA 1. Konačno, SOD vrednosti bile su značajno više u PA-MSHA 1 grupi u odnosu na kontrolu, ali i PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 grupu.

U homogenatu tkiva srca mužjaka pacova uočeno je značajno povećanje GSH i SOD u PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 grupi u odnosu na kontrolu i PA-MSHA 1. Pored toga, koncentracija IMA bila je viša u PA-MSHA 1 i PA-MSHA 2 u odnosu na kontrolu, dok je nivo MDA u PA-MSHA 3 grupi bio značajno veći u odnosu na PA-MSHA 1.

Na kraju, povećanje GSH nivoa u timusu tretiranih mužjaka pacova dobijeno je samo u PA-MSHA 2 grupi (u odnosu na kontrolu). IMA vrednosti bile su značajno povišene u PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 grupi u odnosu na PA-MSHA 1, ali ne i kontrolnu. Dodatno aktivnost MDA i SOD rasla je sa porastom primenjene doze PA-MSHA, pa je tako bila viša u PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 grupama u odnosu na kontrolu i PA-MSHA 1 grupu. Statistički značajna razlika između grupa naznačena je u Tabeli 62.

Tabela 62. Uticaj rastućih doza PA-MSHA na parametre oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite kod mužjaka pacova nakon subakutne ekspozicije

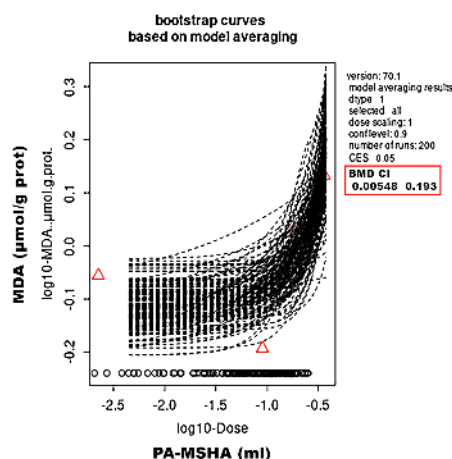
Uzorak	Parametar (jed.)	Kontrola	PA-MSHA 1	PA-MSHA 2	PA-MSHA 3
Plazma	IMA (ng/L)	23,62 ± 3,039	27 ± 6,145	19,58 ± 2,022 *	21,9 ± 2,665 *
	MDA (μmol/L)	2,732 ± 0,5288	2,222 ± 0,3474	3,8 ± 0,42 ** ***	2,4.3 ± 0,5981 ##
	SH (mmol/L)	0,9379 ± 0,2267	0,9933 ± 0,1212	0,6659 ± 0,3273	0,5475 ± 0,38 * *
Bubreg	GSH (μmol/g prot)	775 ± 307	1257 ± 675	1186 ± 694	725 ± 279

	IMA (ng/g prot)	239,1 ± 64,38	375,5 ± 160,5 *	282,2 ± 65	213,8 ± 39,24 +
	MDA (μmol/g prot)	77,74 ± 0,9322	78,92 ± 2,875	78,47 ± 1,011	77,29 ± 0,5931
	SH (mmol/g prot)	17,14 ± 6,206	19,69 ± 9,132	14,55 ± 6,392	12,69 ± 3,682
	SOD (U/g prot)	75 ± 13	138 ± 67	97 ± 25	79 ± 67
Jetra	IMA (ng/g prot)	28,39 ± 6,913	29,9 ± 9,397	21,49 ± 2,512	21,96 ± 4,213
	MDA (μmol/g prot)	0,94 ± 0,41	0,65 ± 0,11	1,1 ± 0,25 +	1,4 ± 0,4 * ++
	SH (mmol/g prot)	0,555 ± 0,1658	0,3927 ± 0,1401	0,4937 ± 0,08479	0,363 ± 0,114 *
	SOD (U/g prot)	2,725 ± 0,381	2,1 ± 0,7037	2,559 ± 0,4928	2,695 ± 0,5734
Pluća	GSH (μmol/g prot)	2,278 ± 0,7543	2,877 ± 1,922	0,6954 ± 0,0951 *	1,404 ± 0,5071 *
	IMA (ng/g prot)	6,656 ± 0,6748	9,111 ± 0,7748 **	7,535 ± 1,494 +	8,092 ± 1,062 *
	MDA (μmol/g prot)	0,84 ± 0,12	1,2 ± 0,49	1,1 ± 0,43	1,2 ± 0,57
	SOD (U/g prot)	0,7157 ± 0,1223	2,198 ± 1,334 **	1,054 ± 0,5 +	0,8767 ± 0,09 ++
Srce	GSH (μmol/g prot)	6,097 ± 0,6928	6,021 ± 0,5661	21 ± 6,4 **** +	18,9 ± 5,8 *** ++
	IMA (ng/g prot)	8,947 ± 0,406	10,42 ± 0,577 *	10,1 ± 0,582 *	9,563 ± 1,304
	MDA (μmol/g prot)	1,8 ± 0,56	1,2 ± 0,44	1,8 ± 0,27	2,1 ± 0,24 +
	SOD (U/g prot)	1,225 ± 0,402	2,578 ± 1,077	4,57 ± 1,49 *** +	3,438 ± 1,229 **
Timus	GSH (μmol/g prot)	5,971 ± 1,358	6,034 ± 1,41	9,241 ± 1,37 ** ++	6,908 ± 0,9585
	IMA (ng/g prot)	13,43 ± 2,907	9,966 ± 0,4466	14,73 ± 3,405 +	15,17 ± 3,144 +
	MDA (μmol/g prot)	1,3 ± 0,8	1,5 ± 0,21	2,1 ± 0,2 *	2,1 ± 0,69 *
	SOD (U/g prot)	1,083 ± 0,2521	0,7741 ± 0,5754	1,41 ± 0,387 +	1,86 ± 0,55 ** ++

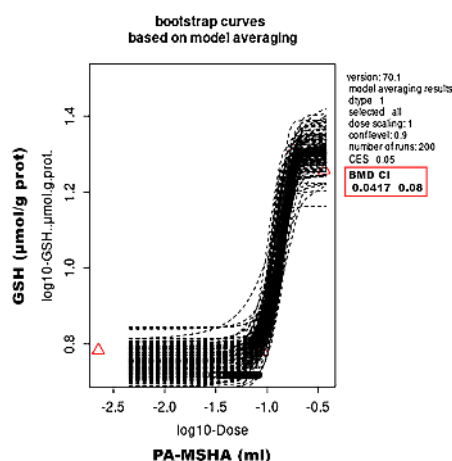
* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001 (u odnosu na kontrolu); + p<0,05; ++ p<0,01; +++ p<0,001; +++++ p<0,0001 (u poređenju sa PA-MSHA 1); ## p<0,01 (u poređenju sa PA-MSHA 2). Kontrola: kukuruzno ulje; PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,09 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,18 x 10⁹ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (0,36 x 10⁹ ćelija/ml). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD). IMA: ishemijom modifikovani albumin; MDA: malondialdehid; SH: ukupne sulfhidrilne grupe; GSH: glutation; SOD: super oksid dismutaza

Odnos primenjene doze i odgovora (promene nivoa odnosno aktivnosti parametara oksidativnog stresa) analiziran je pomoću BMD analize i dobijeni rezultati predstavljeni su grafički. Uočene promene u plazmi i homogenatu tkiva bubrega mužjaka pacova nisu zavisile od primenjene doze PA-MSHA za razliku od MDA parametra u jetri tretiranih pacova. Na slici 46 uočava se ushodna kriva koja ukazuje na to da primena 0,00548 x 10⁹ ćelije/ml PA-MSHA može dovesti do 5% povećanja koncentracije MDA u jetri mužjaka pacova.

U plućima mužjaka pacova, sa porastom primenjene doze PA-MSHA dolazi do smanjenja nivoa GSH i porasta koncentracije IMA. Međutim, izračunati BMDU/BMDL interval bio je širok sugerišući nepostojanje odnosa primenjena doza PA-MSHA-odgovor, odnosno promena nivoa parametara oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite u plućima tretiranih pacova. Suprotno tome, u srcu pacova uočeno je pozitivna korelacija između doze PA-MSHA i nivoa GSH, pri čemu je interval pouzdanosti uzak što ukazuje na visoku pouzdanost rezultata (Slika 47).



Slika 46. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i koncentracije MDA u jetri mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije
MDA: malodialdehid; PA-MSHA ($0,09 \times 10^9$ ćelije/ml, $0,18 \times 10^9$ ćelije/ml, $0,36 \times 10^9$ ćelije/ml); Broj iteracija: 200. PA-MSHA: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*



Slika 47. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i koncentracije GSH u srcu mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije
GSH: glutation. PA-MSHA ($0,09 \times 10^9$ ćelije/ml, $0,18 \times 10^9$ ćelije/ml, $0,36 \times 10^9$ ćelije/ml); Broj iteracija: 200. PA-MSHA: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Tabela 63 prikazuje parametre oksidativnog stresa kod ženki pacova u kontrolnoj grupi i grupama tretiranim rastućim dozama PA-MSHA.

U plazmi ženki pacova dobijeno je značajno smanjenje IMA i porast MDA u eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolu dok se vrednosti SH nisu razlikovale.

U homogenatu tkiva bubrega ženki pacova jedino je uočena razlika između eksperimentalnih grupa u nivou SOD. U PA-MSHA 1 grupi nivo SOD bio je značajno viši u odnosu na PA-MSHA 2 i PA-MSHA-3 grupu. Razlika u odnosu na kontrolu nije bila od značaja.

Dalje, u homogenatu tkiva jetre, samo se nivo MDA u grupi PA-MSHA 3 izdvojio kao značajno različit od kontrole, ali i PA-MSHA 1 i PA-MSHA 2 eksperimentalnih grupa. Ostali izmereni parametri oksidativnog stresa nisu se značajno razlikovali od kontrole.

U homogenatu tkiva pluća ženki pacova parametri oksidativnog stresa nisu bili značajno izmenjeni nakon tretmana PA-MSHA. Uočeno je smanjenje aktivnosti SOD u eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolu, ali je samo razlika između PA-MSHA 3 bila statistički značajna.

Kao i kod mužjaka pacova, nivo GSH i SOD bio je viši u homogenatu tkiva srca tretiranih ženki pacova u sve 3 eksperimentalne grupe. Poređenjem svih grupa međusobno, uočeno je smanjenje IMA u PA-MSHA 2 grupi u odnosu na PA-MSHA 1 kao i smanjenje SOD u PA-MSHA 3 u odnosu na PA-MSHA 1. Konačno, u homogenatu timusa ženki pacova tretiranih PA-MSHA porast MDA uočen je u svim grupama u odnosu na kontrolu, ali je efekat bio najizraženiji u PA-MSHA 1 grupi ($p < 0,01$). Značajan porast nivoa GSH zabeležen je samo u PA-MSHA 2 grupi u odnosu na kontrolu, a IMA u PA-MSHA 1 i PA-MSHA 3. Porast SOD takođe je uočen u sve tri eksperimentalne grupe, ali razlika između PA-MSHA 3 i kontrole nije bila značajna.

Tabela 63. Uticaj rastućih doza PA-MSHA na parametre oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite kod ženki pacova nakon subakutne ekspozije

Uzorak	Parametar (jed.)	Kontrola	PA-MSHA 1	PA-MSHA 2	PA-MSHA 3
Plazma	IMA (ng/L)	26,17 ± 1,951	21,7 ± 2,634 *	22,59 ± 2,298 *	24,3 ± 3,044
	MDA (μmol/L)	1,599 ± 0,6408	2,463 ± 0,1642 *	2,84 ± 0,482 **	2,914 ± 0,556 **
	SH (mmol/L)	1,199 ± 0,339	1,07 ± 0,278	0,9646 ± 0,306	1,054 ± 0,1028
Bubreg	GSH (μmol/g prot)	394 ± 155	1028 ± 345 ***	642 ± 124 +	580 ± 109 ++
	IMA (ng/g prot)	162,9 ± 47,15	194,1 ± 50,81	197,7 ± 13,9	200,7 ± 47,34
	MDA (μmol/g prot)	70,69 ± 13,55	77,19 ± 0,5888	78,47 ± 1,011	77,29 ± 0,5931
	SH (mmol/g prot)	9,132 ± 2,285	9,406 ± 2,781	12,14 ± 1,696	11,07 ± 2,854
	SOD (U/g prot)	39 ± 17	63 ± 35	30 ± 13 +	24 ± 9,5 +
Jetra	IMA (ng/g prot)	30,36 ± 1,268	26,31 ± 2,734	27,39 ± 5,196	28,64 ± 2,673
	MDA (μmol/g prot)	1,1 ± 0,34	1 ± 0,31	0,93 ± 0,35	1,9 ± 0,85 * + ##
	SH (mmol/g prot)	0,3949 ± 0,07736	0,3735 ± 0,04749	0,4117 ± 0,0943	0,469 ± 0,1899
	SOD (U/g prot)	2,53 ± 0,3628	3,091 ± 1,441	2,637 ± 0,7092	3,407 ± 0,9594
Pluća	GSH (μmol/g prot)	3,419 ± 2,16	1,913 ± 1,068	1,435 ± 0,5963	1,739 ± 1,162
	IMA (ng/g prot)	7,753 ± 1,093	7,607 ± 0,6804	7,652 ± 1,033	7,192 ± 1,497
	MDA (μmol/g prot)	1,7 ± 0,89	1,8 ± 1,2	1 ± 0,41	1,5 ± 0,3
	SOD (U/g prot)	1,1 0,56 - 1,4	0,8 0,62 - 2,1	0,74 0,56 - 1,2	0,65 * 0,23 - 0,7
Srce	GSH (μmol/g prot)	7,22 ± 1,073	12,25 ± 2,954 *	11,04 ± 0,4011 *	17,39 ± 2,215 *
	IMA (ng/g prot)	9,637 ± 1,569	11,12 ± 0,6396	8,935 ± 1,464 +	10,44 ± 0,8743
	MDA (μmol/g prot)	2,1 ± 1,3	1,8 ± 0,17	1,8 ± 0,49	1,3 ± 0,28
	SOD (U/g prot)	1,541 ± 0,3261	3,247 ± 1,32 **	2,584 ± 0,3782 *	2,262 ± 0,45 +
Timus	GSH (μmol/g prot)	6,544 ± 1,822	9,193 ± 3,085	10,68 ± 2,642 *	9,461 ± 2,05
	IMA (ng/g prot)	9,962 ± 2,566	14,56 ± 1,362 *	10,93 ± 1,932	17 ± 4,575 *
	MDA (μmol/g prot)	1,2 0,64 - 1,6	1,9 ** 1,5 - 3,9	2,0 * 1,6 - 2,4	1,6 * 1,3 - 6,4
	SOD (U/g prot)	0,6749 ± 0,4634	1,76 ± 0,67 **	1,578 ± 0,4014 *	1,064 ± 0,6285

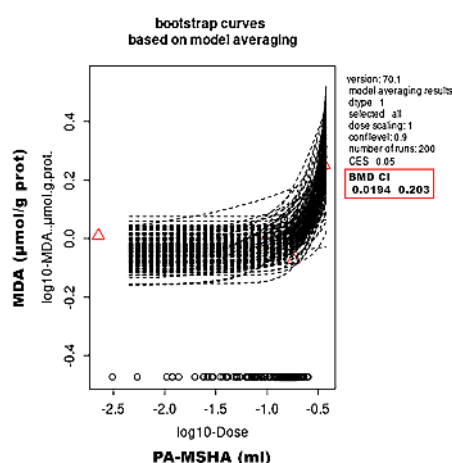
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (u odnosu na kontrolu); + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$ (u poređenju sa PA-MSHA 1); # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ (u poređenju sa SFN 2). Kontrola: kukuruzno ulje; PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,36 \times 10^9$ ćelija/ml). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference, LSD*)/Neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test. IMA: ishemjom modifikovani albumin; MDA: malondialdehid; SH: ukupne sulfhidrilne grupe; GSH: glutation; SOD: superoksid dismutaza.

Nije pronađen dozno-zavisni odgovor u plazmi i bubrezima tretiranih pacova, ali je uočen trend rasta nivoa GSH u bubrezima ženki pacova.

S druge strane, nivo MDA u jetri ženki pacova, zavisio je od doze PA-MSHA, pri čemu primena $0,0194 \times 10^9$ ćelije/ml dovodi do 5% povećanja MDA. Dodatno, BDMU/BMDL interval bio je uzak sugerišući visoku pouzdanost dobijenih rezultata (Slika 48).

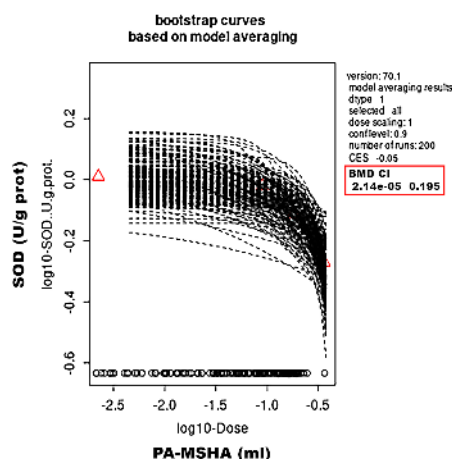
Na slici 49 predstavljen je grafik zavisnosti PA-MSHA i SOD u plućima ženki pacova. Nishodni trend krive ukazuje na negativan učinak primene PA-MSHA na aktivnost SOD u plućima tretiranih životinja, ali je za potvrdu dozno-zavisnosti neophodno ispitati veći broj doza PA-MSHA.

Takođe, izračunati su i intervali pouzdanosti za nivo GSH u srcu i timusu tretiranih ženki pacova, kao i MDA u timusu, ali nisu zadovoljili zadate kriterijume pouzdanosti rezultata.



Slika 48. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i koncentracije MDA u jetri ženki pacova nakon 28 dana ekspozicije

MDA: malondialdehid. PA-MSHA ($0,09 \times 10^9$ ćelije/ml, $0,18 \times 10^9$ ćelije/ml, $0,36 \times 10^9$ ćelije/ml); Broj iteracija: 200. PA-MSHA: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*



Slika 49. Grafički prikaz modelovanja odnosa rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i koncentracije SOD u plućima ženki pacova nakon 28 dana ekspozicije

SOD: super oksid dismutaza. PA-MSHA ($0,09 \times 10^9$ ćelije/ml, $0,18 \times 10^9$ ćelije/ml, $0,36 \times 10^9$ ćelije/ml); Broj iteracija: 200. PA-MSHA: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

4.3.2.8.3. Kombinovana primena imunomodulatora

Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite određivani su u plazmi i homogenatima tkiva bubrega, jetre, pluća, srca i timusa i kod mužjaka pacova tretiranih kombinacijom SFN i PA-MSHA tokom 28 dana u 3 dozna nivoa. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 64.

U plazmi tretiranih pacova uočen je porast nivoa SH u odnosu na kontrolu, pri čemu je efekat bio najizraženiji u MIX 1 grupi. Dodatno, u MIX 3 grupi zabeležen je značajan porast koncentracije MDA u odnosu na MIX 2.

U homogenatu tkiva bubrega pacova uočen je blagi porast MDA u MIX 2 grupi u odnosu na kontrolu i MIX 1, kao i porast nivoa SOD u MIX 3 grupi u odnosu na MIX 1. Ostale vrednosti parametara oksidativnog statusa bile su nepromenjene između kontrole i tretiranih grupa.

Dalje, u homogenatu tkiva pluća značajno povećanje nivoa IMA dobijeno je u MIX 1 i MIX 2 grupi u odnosu na kontrolu, dok je MDA bio povišen samo u MIX 2 grupi. Pored toga, zabeleženo je smanjenje nivoa MDA u MIX 3 grupi u odnosu na MIX 2. Takođe, aktivnost SOD takođe je bila statistički značajno povišena u MIX 1 i MIX 2 grupi u poređenju sa kontrolnom.

U homogenatu tkiva srca tretiranih pacova GSH i SOD bili su značajno povišeni u MIX 1 i MIX 2 grupi u odnosu na kontrolu, a sniženi u MIX 3 grupi u odnosu na MIX 1 i MIX 2. Pored toga, u MIX 3 grupi uočen je porast koncentracije IMA u odnosu na MIX 2.

Konačno, u tkivu timusa uočeno je jedino značajno smanjenje nivoa IMA i to u MIX 1 i MIX 2 grupi u odnosu na kontrolu, dok se ostali parametri nisu statistički značajno razlikovali između tretiranih grupa i kontrole.

Tabela 64. Uticaj kombinovane primene rastućih doza SFN i PA-MSHA na parametre oksidativnog statusa kod mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije

Uzorak	Parametar (jed.)	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3
Plazma	IMA (ng/L)	23,62 ± 3,039	25,64 ± 4,946	24,36 ± 2,091	22,64 ± 2,452
	MDA (μmol/L)	2,732 ± 0,5288	2,556 ± 0,8058	2,185 ± 0,6063	3,481 ± 0,7 #
	SH (mmol/L)	0,9379 ± 0,2267	1,32 ± 0,1632 **	1,17 ± 0,1208	1,208 ± 0,1324 *
Bubreg	GSH (μmol/g prot)	775 ± 307	674 ± 282	704 ± 238	574 ± 424
	IMA (ng/g prot)	239,1 ± 64,38	248,2 ± 75,66	386 ± 106,2	298,1 ± 179,8
	MDA (μmol/g prot)	77,74 ± 0,9322	77,02 ± 0,8179	79,04 ± 0,695 * ++	78 ± 1,1
	SH (mmol/g prot)	17,14 ± 6,206	12,9 ± 5,109	21,44 ± 7,207	19 ± 12
	SOD (U/g prot)	75 ± 13	49 ± 24	92 ± 35	134 ± 104 +
Jetra	IMA (ng/g prot)	28,39 ± 6,913	27,99 ± 2,655	25,81 ± 5,986	30,42 ± 1,943
	MDA (μmol/g prot)	0,94 ± 0,41	0,82 ± 0,2	0,81 ± 0,22	0,65 ± 0,13
	SH (mmol/g prot)	0,555 ± 0,1658	0,5287 ± 0,04668	0,3989 ± 0,1315	0,4418 ± 0,09118
	SOD (U/g prot)	2,725 ± 0,381	2,32 ± 0,4218	2,63 ± 0,7247	2,248 ± 0,4816
Pluća	GSH (μmol/g prot)	2,278 ± 0,7543	2,812 ± 0,8856	1,495 ± 0,3138	2,287 ± 0,8568
	IMA (ng/g prot)	6,656 ± 0,6748	8,494 ± 0,652 **	8,348 ± 0,837 **	7,573 ± 0,9176
	MDA (μmol/g prot)	0,84 ± 0,12	1,2 ± 0,43	2,4 ± 1,3 *** +	1,2 ± 0,44 #
	SOD (U/g prot)	0,73 0,56 - 0,86	1,0 * 0,84 - 2,7	1,1 * 0,77 - 4,9	1,1 0,67 - 2,0
Srce	GSH (μmol/g prot)	6,097 ± 0,6928	13,51 ± 2,092 *	18,3 ± 6,7 ***** +	10,63 ± 1,941 ###
	IMA (ng/g prot)	8,947 ± 0,406	9,351 ± 1,153	9,601 ± 0,9397	10,49 ± 1,15 #
	MDA (μmol/g prot)	1,8 ± 0,56	1,8 ± 1,3	1,1 ± 0,34	1,3 ± 0,39
	SOD (U/g prot)	1,225 ± 0,402	2,729 ± 1,07 **	3,573 ± 0,78 ***	1,55 ± 0,28 + ###
Timus	GSH (μmol/g prot)	5,971 ± 1,358	9,401 ± 2,022	5,329 ± 1,712	8,282 ± 1,776
	IMA (ng/g prot)	13,43 ± 2,907	10,81 ± 1,281 *	10,24 ± 1,3 *	11,09 ± 1,287
	MDA (μmol/g prot)	1,3 ± 0,8	1,4 ± 0,31	1,8 ± 0,58	1,4 ± 0,19
	SOD (U/g prot)	1,083 ± 0,2521	0,9875 ± 0,3222	0,5884 ± 0,3732	1,054 ± 0,5583

* p<0,05 (u poređenju sa kontrolom); + p<0,05; ++ p<0,01 (u poređenju sa MIX 1); # p<0,05 (u poređenju sa MIX 2). Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD)/Neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test. Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, n = 5. MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + 0,09 x 10⁹ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + 0,18 x 10⁹ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + 0,36 x 10⁹ ćelija/ml). IMA: ishemjom modifikovani albumin; MDA: malondialdehid; SH: ukupne sulfhidrilne grupe; GSH: glutation; SOD: super oksid dismutaza SFN - sulforafan; PA-MSHA - inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Korišćenjem PROAST softvera sprovedena je BMD analiza u cilju razjašnjenja odnosa primenjenih doza i promena parametara oksidativnog statusa u plazmi, odnosno tkivima mužjaka pacova i nije putvrdjen ni jedan dozni interval pouzdanosti za prethodno izmerene parameter.

Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite određivani su u plazmi i homogenatima tkiva bubrega, jetre, pluća, srca i timusa i kod ženki pacova tretiranih

kombinacijom SFN i PA-MSHA tokom 28 dana u 3 dozna nivoa. U Tabeli 65 sumirani su dobijeni rezultati.

U plazmi tretiranih ženki pacova zabeleženo je smanjenje nivoa IMA u MIX 3 grupi, a porast MDA u MIX 1 i MIX 2 grupi u odnosu na kontrolu.

U homogenatu tkiva bubrega ženki pacova uočene su promene u svim izmerenim parametrima oksidativnog statusa. Nivo GSH značajno je viši u MIX 1 i MIX 2 grupi u odnosu na kontrolu. U MIX 3 grupi dolazi do smanjenja vrednosti GSH koja je značajno niža u odnosu na MIX 1. Dalje, koncentracija IMA, takođe, je bila viša u grupama MIX 1 i MIX 2 u poređenju sa kontrolom, dok je nivo MDA bio značajno viši u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolu. Porast SH grupa dobijen je u sve tri tretirane grupe, ali je jedino u MIX 1 bio statistički značajno različit od kontrole, dok je nivo SH u MIX 3 grupi bio značajno niži u odnosu na MIX 1. Aktivnost SOD bila je najviša u MIX 3 grupi, značajno viša u odnosu na kontrolu, ali i MIX 1 i MIX 2.

U homogenatu tkiva jetre ženki pacova jedino je uočeno smanjenje IMA u MIX 2 grupi u odnosu na MIX 1 dok su ostale vrednosti bile slične između kontrolne i eksperimentalnih grupa.

U homogenatu tkiva pluća, nivo GSH bio je snižen u tretiranim grupama u odnosu na kontrolu, pri čemu je efekat bio najizraženiji u MIX 3 grupi ($p < 0,01$). Pored toga, uočen je značajan porast SOD u MIX 2 grupi u odnosu na kontrolu i MIX 1 i smanjenje u MIX 3 grupi u odnosu na MIX 2.

Dalje, u homogenatu pluća ženki pacova tretiranih kombinacijom SFN i PA-MSHA zabeleženo je značajno povećanje GSH u MIX 3 grupi u odnosu na kontrolu, ali i ostale dve eksperimentalne grupe (MIX 1 i MIX 2). Blagi porast aktivnosti SOD dobijen je u MIX 3 grupi u odnosu na kontrolu. Pored toga, kombinovani tretman doveo je do smanjenja nivoa MDA u MIX 2 grupi u odnosu na kontrolu i porasta u MIX 3 grupi u odnosu na MIX 1.

Konačno, u homogenatu timusa pacova uočen je značajan porast nivoa MDA u sve tri eksperimentalne grupe, pri čemu je nivo bio viši u MIX 2 i MIX 3 grupi u odnosu na MIX 1. Dodatno, u odnosu na kontrolu, nivo SOD bio je statistički značajno viši samo u MIX 2 grupi.

Tabela 65. Uticaj kombinovane primene rastućih doza SFN i PA-MSHA na parametre oksidativnog statusa kod mužjaka pacova nakon 28 dana ekspozicije

Uzorak	Parametar (jed.)	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3
Plazma	IMA (ng/L)	26,17 ± 1,951	25,19 ± 10,05	21,77 ± 3,859	19,53 ± 2,674 *
	MDA (μmol/L)	1,599 ± 0,6408	2,167 ± 0,339 *	2,389 ± 0,344 *	2,385 ± 0,6695
	SH (mmol/L)	1,199 ± 0,339	1,216 ± 0,2325	1,225 ± 0,1564	1,151 ± 0,3474
Bubreg	GSH (μmol/g prot)	394 ± 155	767 ± 157 **	606 ± 180 *	480 ± 131 +
	IMA (ng/g prot)	162,9 ± 47,15	273,8 ± 14,96 **	265,3 ± 74,21 **	223,6 ± 39,01
	MDA (μmol/g prot)	76 43 - 77	78 ** 77 - 79	77 ** 77 - 80	78 * 77 - 79
	SH (mmol/g prot)	9,132 ± 2,285	15,6 ± 2,79 **	12,8 ± 4,44	11,02 ± 1,645 +

	SOD (U/g prot)	39 ± 17	85 ± 34 *	70 ± 29	133 ± 46 *** + ##
Jetra	IMA (ng/g prot)	30,36 ± 1,268	33,96 ± 4,325	27,72 ± 2,54 +	31,66 ± 5,575
	MDA (μmol/g prot)	1,1 ± 0,34	0,97 ± 0,3	0,86 ± 0,17	0,94 ± 0,03
	SH (mmol/g prot)	0,3949 ± 0,07736	0,4083 ± 0,07233	0,4521 ± 0,1074	0,544 ± 0,04874
	SOD (U/g prot)	2,53 ± 0,3628	2,252 ± 0,3343	2,613 ± 0,4105	0,462 ± 0,8347
Pluća	GSH (μmol/g prot)	3,419 ± 2,16	1,256 ± 0,74 *	1,675 ± 0,9338	0,763 ± 0,32 **
	IMA (ng/g prot)	7,753 ± 1,093	8,424 ± 1,213	9,089 ± 2,133	8,439 ± 0,6023
	MDA (μmol/g prot)	1,7 ± 0,89	0,94 ± 0,29	1,4 ± 0,62	1,4 ± 0,43
	SOD (U/g prot)	1,065 ± 0,2869	1,003 ± 0,277	1,93 ± 0,643 * +	0,9537 ± 0,19 #
Srce	GSH (μmol/g prot)	7,22 ± 1,073	6,023 ± 1,852	10,95 ± 1,26	14,3 ± 5,13 *** ++ #
	IMA (ng/g prot)	9,637 ± 1,569	10,31 ± 1,147	10,49 ± 0,6836	10,97 ± 0,6811
	MDA (μmol/g prot)	2,1 ± 1,3	1,4 ± 0,33	1 ± 0,38 *	2,1 ± 0,55 #
	SOD (U/g prot)	1,541 ± 0,3261	2,456 ± 0,8852	2,19 ± 1,207	2,789 ± 0,93 *
Timus	GSH (μmol/g prot)	6,544 ± 1,822	7,128 ± 1,929	7,97 ± 1,948	7,625 ± 2,185
	IMA (ng/g prot)	9,962 ± 2,566	11,67 ± 2,275	12,22 ± 2,83	12,63 ± 2,688
	MDA (μmol/g prot)	1,1 ± 0,34	1,8 ± 0,69 *	2 ± 0,28 **	2,2 ± 0,48 **
	SOD (U/g prot)	0,6749 ± 0,4634	1,237 ± 0,3725	1,824 ± 0,883 **	1,396 ± 0,4447

* p<0,05 (u poređenju sa kontrolom); + p<0,05; ++ p<0,01 (u poređenju sa MIX 1); # p<0,05 (u poređenju sa MIX 2). Statistički test: jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) u kombinaciji sa Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD)/Neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test. Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardne devijacije, broj životinja u grupi, n = 5. MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + 0,09 x 10⁹ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + 0,18 x 10⁹ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + 0,36 x 10⁹ ćelija/ml). IMA: ishemjom modifikovani albumin; MDA: malondialdehid; SH: ukupne sulfhidrilne grupe; GSH: glutation; SOD: super oksid dismutaza SFN - sulforafan; PA-MSHA - inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Kao i kod mužjaka pacova, sprovedena BMD analiza u cilju daljeg razjašnjenja odnosa primenjenih doza i promena parametara oksidativnog statusa u plazmi, odnosno tkivima ženki pacova nije utvrdila ni jedan dozni interval pouzdanosti.

4.3.2.9. Kritični toksični efekti

U tabeli 66 sumirani su kritični toksični efekti, odnosno dozno-zavisni efekti ispitivanih imunomodulatora uočeni kod mužjaka i ženki pacova na nivou različitih parametara praćenih u ovoj doktorskoj disertaciji. Kritični toksični efekti su oni čija je izračunata BMDL vrednost bila najniža u ispitivanoj grupi parametara (hematološki, biohemijski parametri, nivo hormona, produkcija proteina, parametri oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite).

Tabela 66. Kritični toksični efekti SFN i PA-MSHA i BMDL vrednosti dobijene modelovanjem odnosa doza-odgovor

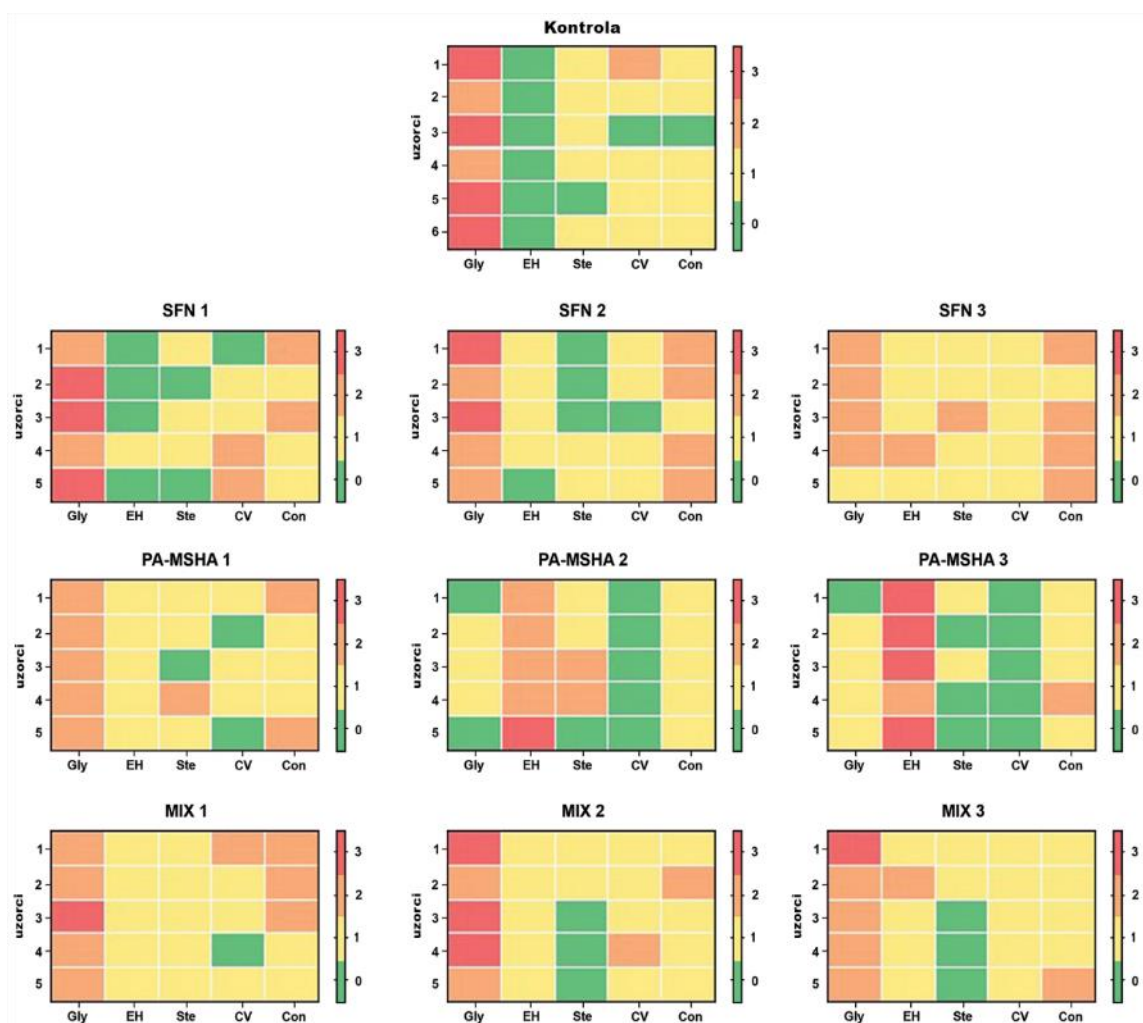
	SFN		PA-MSHA	
	Mužjaci	Ženke	Mužjaci	Ženke
Parametar (jedinica)	BMDL (mg/kg t.m/dan)		BMDL (ćelije/ml)	
Neutrofili (%)	0,0105	/	/	/
IFN γ (pg/ml)	/	/	/	0,00287 x 10 ⁹
TGF β (pg/g prot)	/	/	0,000162 x 10 ⁹	/
SH bubreg (mmol/g prot)	/	0,00054	/	/

Donji nivo pouzdanosti Benchmark doze (BMDL), interferon gama (IFN γ), TGF β (transformišući faktor rasta beta), SH (SH grupe), SFN: sulforafan, PA-MSHA: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

4.3.2.10. Patohistološka analiza tkiva

4.3.2.10.1. Jetra

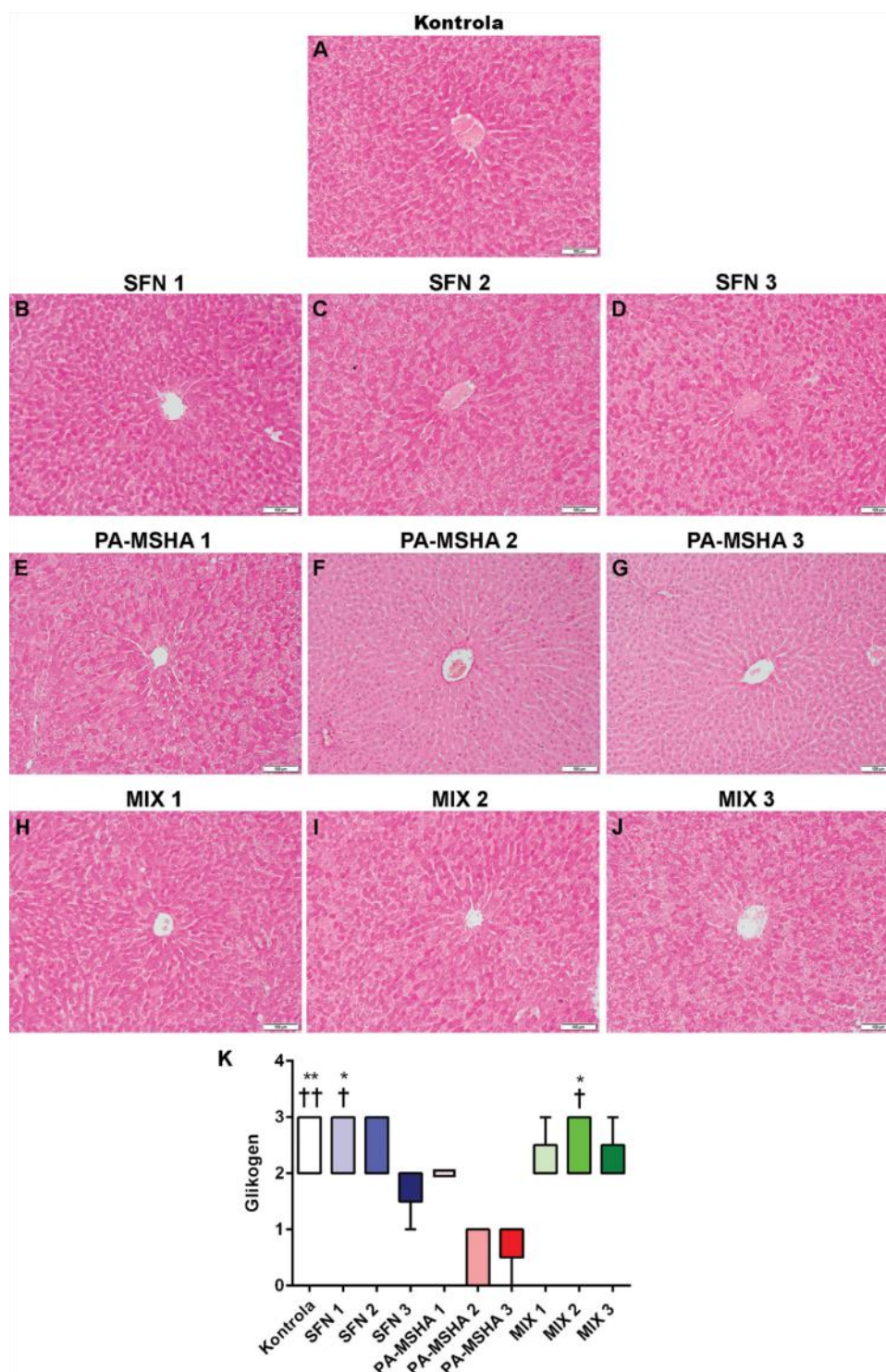
Patohistološkom analizom ocenjivani su sledeći parametri: deponovanje glikogena (Gly), hepatociti sa eozinofilnom citoplazmom (EH), steatoza (Ste), citoplazmatska vakuolizacija (CV) i kongestija (Con) u svakom od uzoraka tkiva jetre pojedinačno. Na slici 50 prikazani su dobijeni rezultati u vidu toplotnih mapa gde je svaka ocena predstavljena posebno.



Slika 50. Prikaz ocena histoloških parametara u vidu toplotnih mapa u uzorcima tkiva jetre mužjaka pacova u kontrolnoj i tretiranim grupama

Gly: deponovanje glikogena; EH: hepatociti sa eozinofilnom citoplazmom; Ste: steatoza; CV: citoplazmatska vakuolizacija; Con: kongestija. SFN 1: sulforfan (0,5 mg/kg t.m./dan), SFN 2: sulforfan (2 mg/kg t.m./dan), SFN 3: sulforfan (5 mg/kg t.m./dan); PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 1: SFN + PA-MSHA ($0,5 \text{ mg/kg t.m./dan} + 0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA ($2 \text{ mg/kg t.m./dan} + 0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA ($5 \text{ mg/kg t.m./dan} + 0,36 \times 10^9$ ćelija/ml)

Depoziti glikogena u hepatocitima prikazani su na slici 51 (A-J). Dobijeni rezultati ukazuju na smanjeno deponovanje glikogena u tretiranim grupa PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 u poređenju sa kontrolnom grupom, ali i SFN 1 i MIX 2 (Slika 51 A, B, F, G, I, K). Osim grupa PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 (Slika 51 F, G), nijedna druga tretirana grupa nije pokazala značajno smanjenje deponovanja glikogena u poređenju sa kontrolom (Slika 51 A-K).

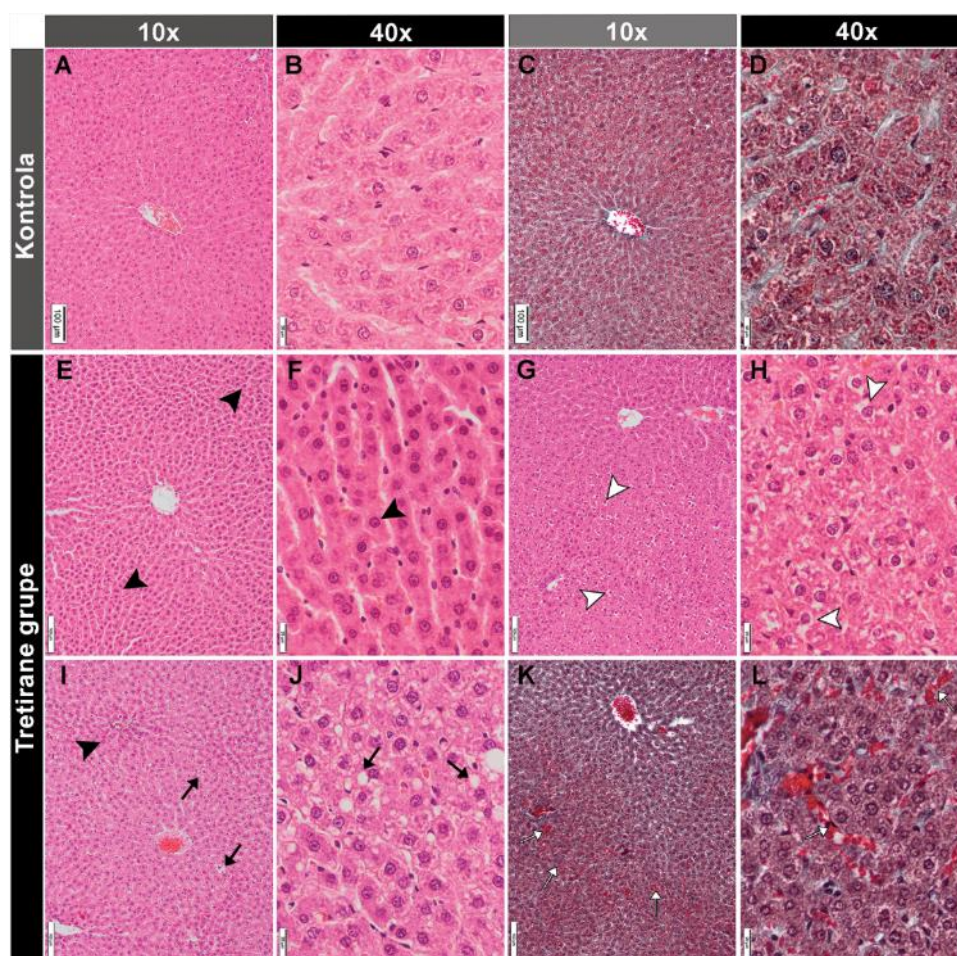


Slika 51. Reprzentativne fotomikrografije preseka jetre na kojima se deponovanje glikogena uočava unutar hepatocita u vidu crvenkasto-ljubičaste boje (PAS-pozitivna reakcija), mužjaka pacova iz kontrolne (A) i SFN 1 (B), SFN 2 (C), SFN 3 (D), PA-MSHA 1 (E), PA-MSHA 2 (F), PA-MSHA 3 (G), MIX 1 (H), MIX 2 (I) i MIX 3 (J) tretiranih grupa. Dijagram prikazuje rezultate statističke analize ocean depozicije glikogena (K)

Preseci tkiva bojeni PAS metodom (engl. *Periodic acid-Schiff*) posmatrani pomoću objektiva 10x (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J) (bar: 100 μ m). Dijagram prikazuje rezultate depozicije glikogena (K) upoređene Kruskal-Volisovim testom + Dunn-ovim testom. Svaki dijagram predstavlja donji i gornji kvartil, odnosno interkvartilni opseg od 25. do 75. percentila, dok linija unutar okvira predstavlja srednju vrednost, a krajevi minimalne i maksimalne vrednosti unutar svake grupe. Statistička značajnost označena je kao + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ (u poređenju sa grupom PA-MSHA 2), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (u poređenju sa grupom PA-MSHA 3). SFN 1: sulforafan (0,5mg/kg t.m/dan), SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m/dan), SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m/dan); PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 2:

inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 1: SFN + PA-MSHA ($0,5 \text{ mg/kg t.m./dan} + 0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA ($2 \text{ mg/kg t.m./dan} + 0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA ($5 \text{ mg/kg t.m./dan} + 0,36 \times 10^9$ ćelija/ml)

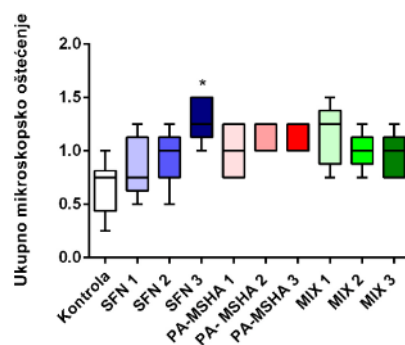
Slika 52 prikazuje normalnu histološku građu tkiva jetre pacova u kontrolnim grupama (Slika 52 A-D) i reprezentativne fotomikrografije histoloških parametara korišćenih za izračunavanje ukupne ocene mikroskopskog oštećenja (Slika 52 E-L). Hepatociti sa eozinofilnom citoplazmom su bili prepoznatljivi po njihovoj homogeno i intenzivno eozinofilno obojenoj citoplazmi i heterohromatičnim jedrima, i bili su rastrkani između hepatocita normalnog izgleda (Slika 52 E, F). Takođe, bili su uočeni i hepatociti sa citoplazmatskom vakuolizacijom rasuti širom preseka (Slika 52 G, H). Steatoza je bila prisutna u mikro- i makrovezikularnoj formi (Slika 52 I, J). Kongestija je podrazumevala proširene i krvlju ispunjene sinusoidne kapilare (Slika 52 K, L).



Slika 52. Reprzentativne fotomikrografije uzoraka tkiva jetre iz kontrolne (A, B, C, D) i tretiranih grupa: PA-MSHA 3 (E, F), MIX 2 (G, H) i SFN 3 (I, J, K, L)

(crna glava strelice – hepatociti sa eozinofilnom citoplazmom; bela glava strelice – citoplazmatska vakuolizacija; crna strelica – steatoza; bela strelica – kongestija). Preseci tkiva bojeni hematoksilinom/eozinom i posmatrani pomoću objektivna 10x (A, E, G, I) (bar: $100 \mu\text{m}$) i pomoću objektivna 40x (B, F, H, J) (bar: $20 \mu\text{m}$). Preseci tkiva bojeni metodom Masson Goldner i posmatrani pomoću objektivna 10x (C, K) (bar: $100 \mu\text{m}$) i pomoću objektivna 40x (D, L) (bar: $20 \mu\text{m}$)

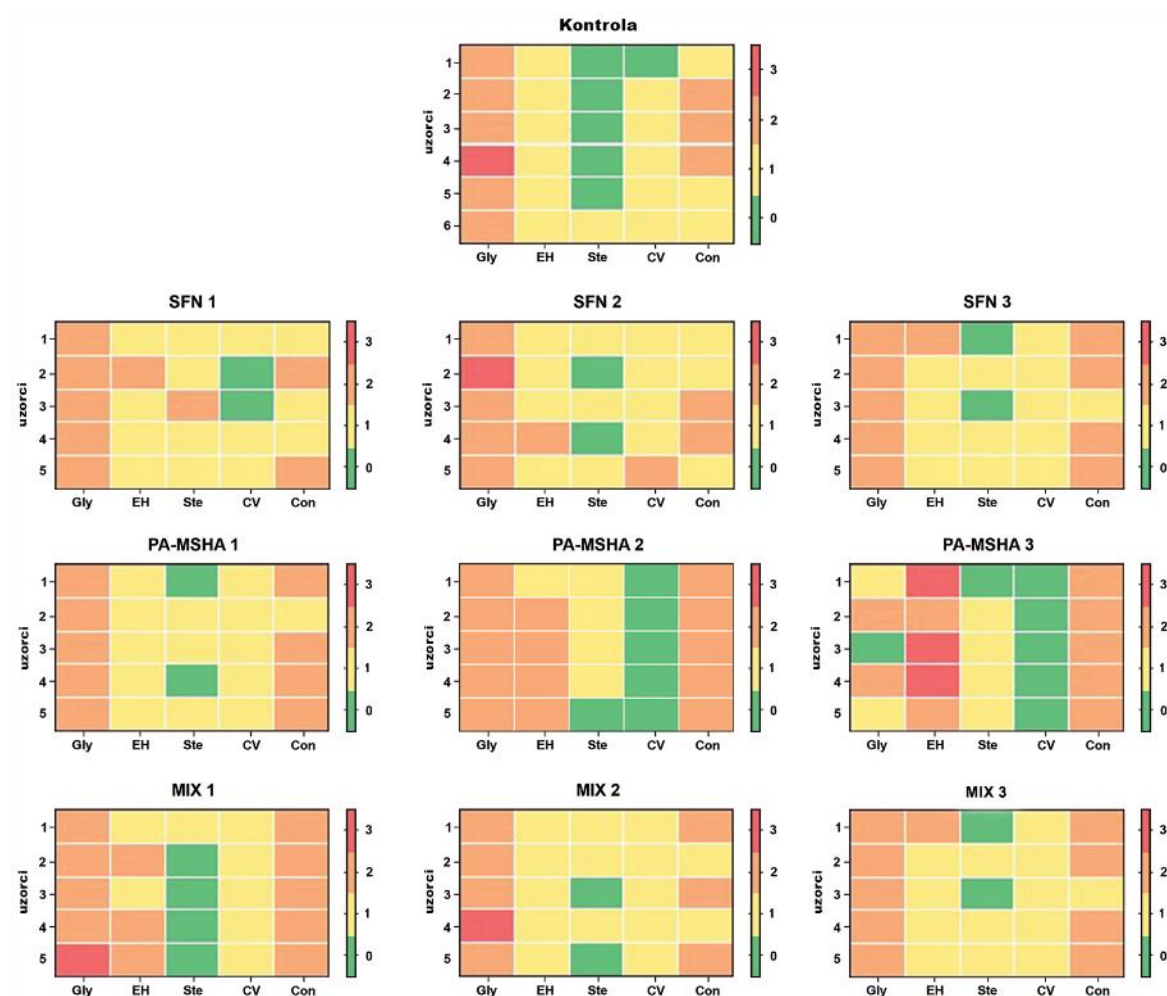
Ukupna ocena mikroskopskog oštećenja tkiva jetre mužjaka pacova bila je značajno veća u SFN 3 grupi u poređenju sa kontrolom (Slika 53). Nije bilo značajne razlike u ukupnoj oceni mikroskopskog oštećenja između bilo koje druge tretirane grupe i kontrole, kao ni između samih tretiranih grupa.



Slika 53. Ukupna ocena mikroskopskog oštećenja tkiva jetre mužjaka pacova u kontrolnoj i svim tretiranim grupama

Svaki dijagram predstavlja donji i gornji kvartil, odnosno interkvartilni opseg od 25. do 75. percentila, dok linija unutar okvira predstavlja srednju vrednost, a krajevi minimalne i maksimalne vrednosti unutar svake grupe. Statistički test: Kruskal-Volison test + Dunn test. Statistička značajnost označena je kao * $p < 0.05$ (u poređenju sa kontrolom). SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m./dan), SFN 2: sulforfan (2 mg/kg t.m./dan), SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m./dan); PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + $0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + $0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + $0,36 \times 10^9$ ćelija/ml)

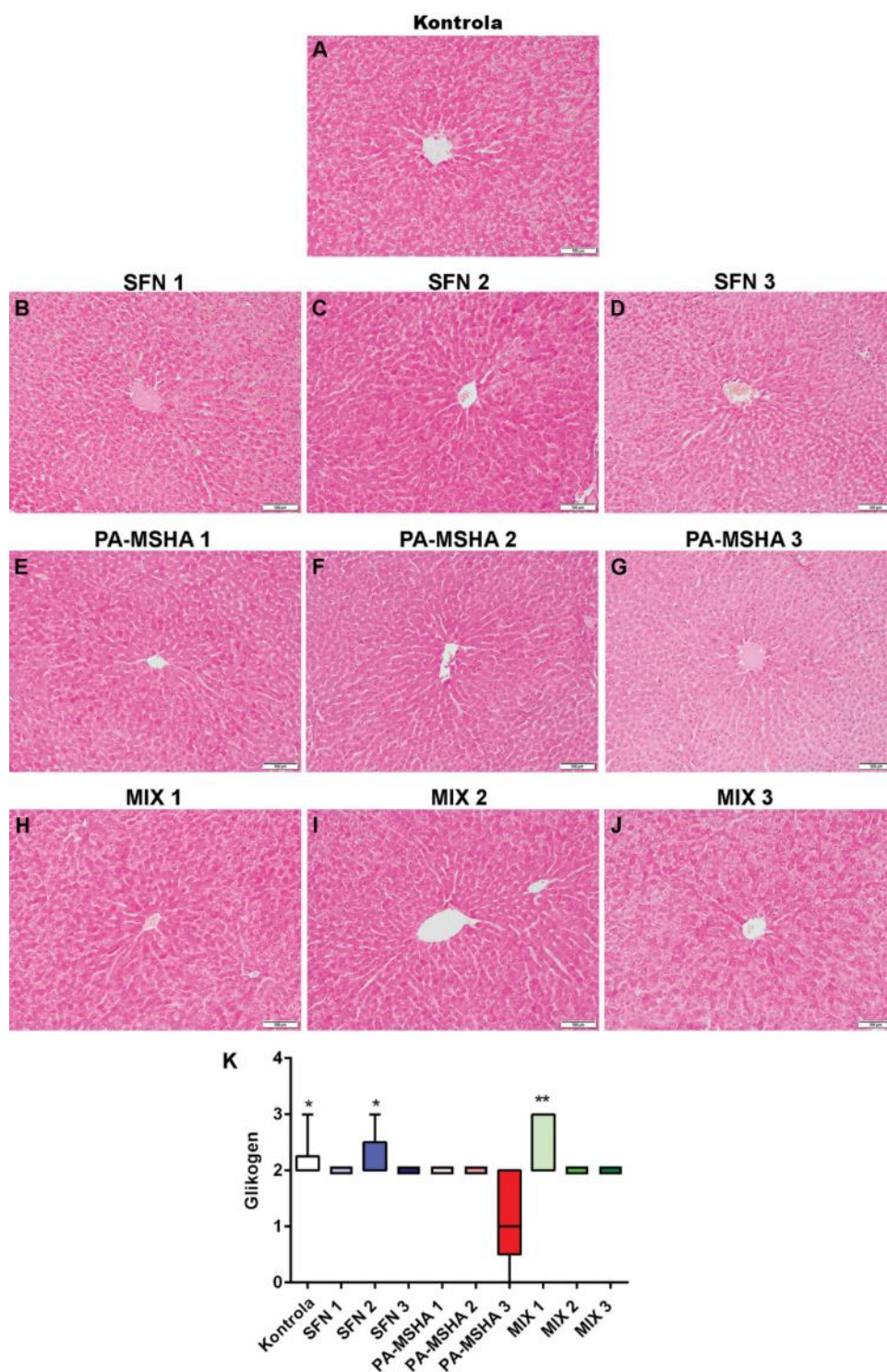
Slika 54 ilustruje individualne rezultate dobijene za svaki od praćenih histoloških parametara (Gly, EH, Ste, CV, Con) u uzorcima tkiva jetre ženki pacova iz kontrole i tretiranih grupa.



Slika 54. Prikaz ocena histoloških parametara u vidu toplotnih mapa u uzorcima tkiva jetre ženki pacova u kontrolnoj i tretiranim grupama

Gly: deponovanje glikogena; EH: hepatociti sa eosinofilnom citoplazmom; Ste: steatoza; CV: citoplazmatska vakuolizacija; Con: kongestija. SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m./dan), SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m./dan), SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m./dan); PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + $0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + $0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + $0,36 \times 10^9$ ćelija/ml)

Depoziti glikogena u tkivu jetre ženki pacova prikazano je na Slici 55 (A-J). Dobijeni rezultati ukazuju na smanjeno deponovanje glikogena u PA-MSHA 3 grupi u poređenju sa kontrolom i tretiranim grupama SFN 2 i MIX 1 (Slika 55 A, C, G, H, K). Osim PA-MSHA 3 grupe (Slika 55 G), nijedna druga tretirana grupa nije pokazala značajno smanjenje depozicije glikogena u odnosu na kontrolu (Slika 55 A-K).

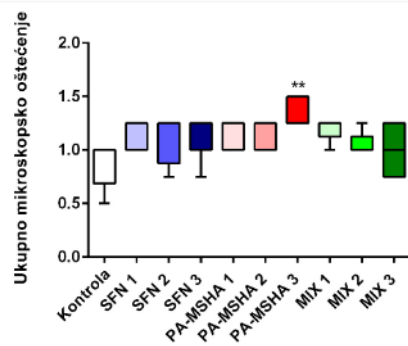


Slika 55. Reprzentativne fotomikrografije preseka jetre na kojima se depoziti glikogena vide unutar hepatocita u vidu crvenkasto-ljubičaste boje (PAS-pozitivna reakcija), ženki pacova iz kontrolne (A) i SFN 1 (B), SFN 2 (C), SFN 3 (D), PA-MSHA 1 (E), PA-MSHA 2 (F), PA-MSHA 3 (G), MIX 1 (H), MIX 2 (I) i MIX 3 (J) tretiranih grupa. Dijagram prikazuje rezultate statističke analize ocean depozicije glikogena (K)

Preseci tkiva bojeni PAS metodom (engl. *Periodic acid-Schiff*) posmatrane pod niskim uvećanjem (10x) (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J) (bar: 100 μ m). Dijagram prikazuje rezultate depozicije glikogena (K) upoređene Kruskal-Volisovim testom + Dunn-ovim testom. Svaki dijagram predstavlja donji i gornji kvartil, odnosno interkvartilni opseg od 25. do 75. percentila, dok linija unutar okvira predstavlja srednju vrednost, a krajevi minimalne i maksimalne vrednosti unutar svake grupe. Statistička značajnost označena je kao * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (u poređenju sa grupom PA-MSHA 3). SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m/dan), SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m/dan), SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m/dan); PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,18 \times 10^9$

ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + $0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + $0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + $0,36 \times 10^9$ ćelija/ml)

Ukupna ocena mikroskopskog oštećenja tkiva jetre ženki pacova bila je značajno veća u PA-MSHA 3 grupi u poređenju sa kontrolom. Nijedna druga tretirana grupa nije pokazala značajnu razliku u ukupnoj oceni mikroskopskog oštećenja jetre u poređenju sa kontrolnom grupom. Dodatno, nisu uočene značajne razlike između tretiranih grupa (Slika 56).



Slika 56. Ukupna ocena mikroskopskog oštećenja tkiva jetre ženki pacova u kontrolnoj i svim tretiranim grupama

Svaki dijagram predstavlja donji i gornji kvartil, odnosno interkvartilni opseg od 25. do 75. percentila, dok linija unutar okvira predstavlja srednju vrednost, a krajevi minimalne i maksimalne vrednosti unutar svake grupe. Statistički test: Kruskal-Volisonov test + Dunn test. Statistička značajnost označena je kao ** $p < 0.01$ (u poređenju sa kontrolom). SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m./dan), SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m./dan), SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m./dan); PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + $0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + $0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + $0,36 \times 10^9$ ćelija/ml)

Pregled sekcija tkiva jetre obojenih metodom Masson Goldner nije otkrio prisustvo fibroze ni kod mužjaka ni kod ženki pacova iz kontrolne niti bilo koje eksperimentalne grupe.

4.3.2.10.2. Slezina

Preseci tkiva slezine pacova oba pola iz kontrolnih i tretiranih grupa pokazale su normalnu histološku građu slezine. U beloju pulpi, PALS je bio prepoznatljiv po prisustvu centralne arterije okružene brojnim limfocitima. Takođe su bili prisutni i LF, ovalne ili okrugle strukture sastavljene od koncentrisanih grupa limfocita. Zavisno od funkcionalnog stanja, neki LF imali su svetlije obojeno središte koje predstavlja germinativni centar, karakterističan za sekundarne LF. Kao što je i očekivano, MZ bila je dobro razvijena i jasno vidljiva kao region kontakta crvene pulpe sa PALS-om i LF-om. Marginalni sinus je odvajao MZ od LF, dok se sa suprotne strane MZ spajala sa Bilrotovim gredicama crvene pulpe. Crvena pulpa se karakterisala svojom crvenkastom bojom koja potiče od brojnih eritrocita prisutnih u venskim sinusima. Duž ovih sinusoida, brojne ćelije crvene pulpe (uključujući Ly i HC) organizovane su u obliku traka (Bilrotovih gredica). Ocene parametara procenjivanih na presecima tkiva slezine mužjaka pacova u kontrolnoj i tretiranim grupama prikazane su tabelarno (Tabela 67-69). Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu uočene su u broju LF (Fol N) u MIX 2 grupi i broju HC u crvenoj pulpi (Red HC) u MIX 3 grupi (Tabela 69).

Tabela 67. Uticaj rastućih doza sulforafana na ocene procenjivanih parametara na presecima tkiva slezine mužjaka pacova nakon 28 dana tretmana

Parametar	Kontrola	SFN 1	SFN 2	SFN 3
Pals S	0	0	0	0
Pals N	0,17 ± 0,75	0 ± 0,71	-0,4 ± 0,55	-0,2 ± 0,45
Pals Ly	0	0	-0,2 ± 0,45	-0,2 ± 0,45
MZ S	0,33 ± 0,52	0,2 ± 0,45	0	-0,2 ± 0,45
MZ Ly	-0,17 ± 0,41	-0,2 ± 0,45	0	0
Fol N	0	0,4 ± 0,55	0,2 ± 0,45	0,2 ± 0,45
Fol Ly	0	0	-0,4 ± 0,55	0
Fol GC	0	0	0,2 ± 0,45	0,2 ± 0,45
Red S	-0,17 ± 0,41	0	0,2 ± 0,45	0
Red Ly	0	0,2 ± 0,45	0	0
Red HC	0 ± 1,41	0 ± 0,71	-0,6 ± 1,52	0,6 ± 0,55

Ocene parametara prikazane su kao srednja vrednost ± standardna devijacija. SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m./dan); SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m./dan); SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m./dan). Površina preska na kojoj je uočljiv PALS (Pals S), broj uočljivih PALS-a (Pals N), gustina Ly u PALS-u (Pals Ly), površina preseka na kojoj je uočljiva MZ (MZ S), gustina Ly u MZ (MZ Ly), broj LF (Fol N), Gustina Ly u LF (Fol Ly), prisustvo germinativnog centra u LF (Fol GC), površina preseka na kojoj je uočljiva crvena pulpa (Red S), gustina Ly u crvenoj pulpi (Red Ly), gustina HC u crvenoj pulpi (Red HC)

Tabela 68. Uticaj rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na ocene procenjivanih parametara na presecima tkiva slezine mužjaka pacova nakon 28 dana tretmana

Parametar	Kontrola	PA-MSHA 1	PA-MSHA 2	PA-MSHA 3
Pals S	0	0	0	0,2 ± 0,45
Pals N	0,17 ± 0,75	0	-0,2 ± 0,45	0
Pals Ly	0	0	-0,2 ± 0,45	0
MZ S	0,33 ± 0,52	0,2 ± 0,45	0	0,2 ± 0,45
MZ Ly	-0,17 ± 0,41	-0,2 ± 0,45	-0,4 ± 0,55	0
Fol N	0	0,2 ± 0,45	0,2 ± 0,45	0,8 ± 0,45
Fol Ly	0	0,2 ± 0,45	-0,2 ± 0,45	0
Fol GC	0	0,4 ± 0,55	0	0
Red S	-0,17 ± 0,41	0 ± 0,71	0,0 ± 0,45	0 ± 0,71
Red Ly	0	0,2 ± 0,45	0	0
Red HC	0 ± 1,41	2,2 ± 1,3	1,4 ± 1,14	2 ± 1,41

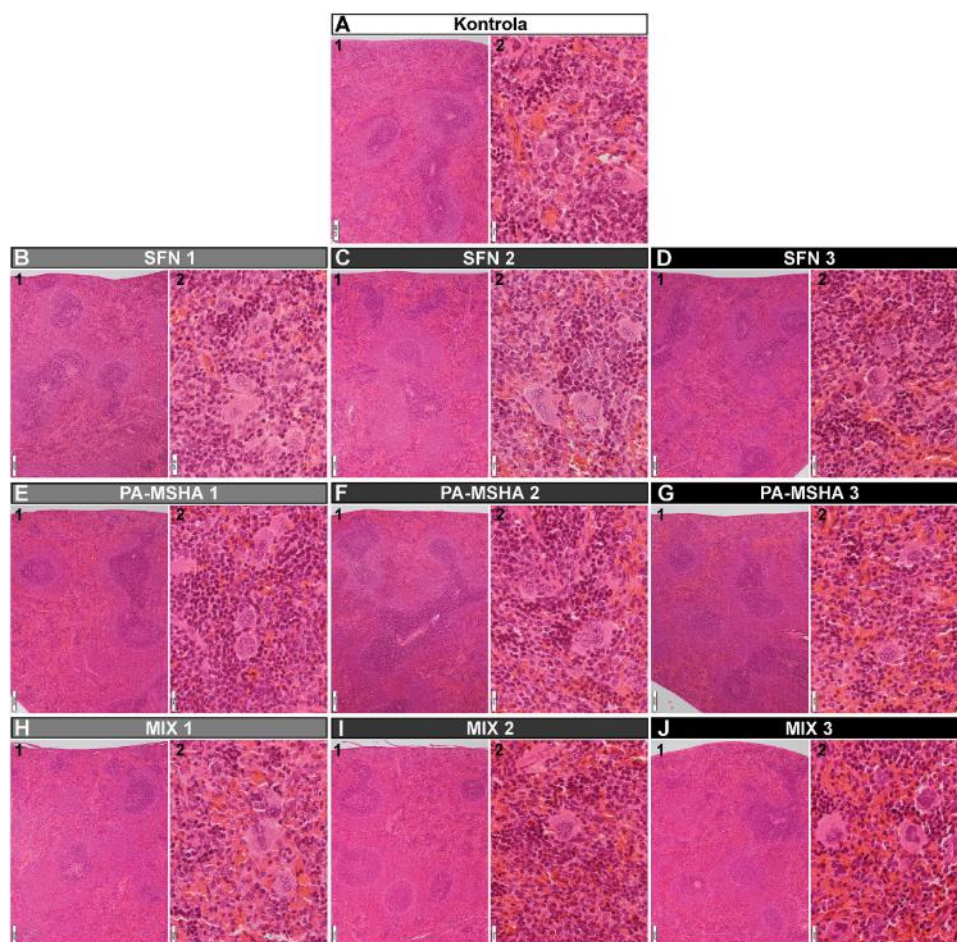
Ocene parametara prikazane su kao srednja vrednost ± standardna devijacija. PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,09 \times 10^9$ ćelije/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,18 \times 10^9$ ćelije/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,36 \times 10^9$ ćelije/ml). Površina preska na kojoj je uočljiv PALS (Pals S), broj uočljivih PALS-a (Pals N), gustina Ly u PALS-u (Pals Ly), površina preseka na kojoj je uočljiva MZ (MZ S), gustina Ly u MZ (MZ Ly), broj LF (Fol N), Gustina Ly u LF (Fol Ly), prisustvo germinativnog centra u LF (Fol GC), površina preseka na kojoj je uočljiva crvena pulpa (Red S), gustina Ly u crvenoj pulpi (Red Ly), gustina HC u crvenoj pulpi (Red HC)

Tabela 69. Uticaj kombinovane primene rastućih doza sulforafana i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na ocene procenjivanih parametara na presecima tkiva slezine mužjaka pacova nakon 28 dana tretmana

Parametar	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3
Pals S	0	0	0	0
Pals N	0,17 ± 0,75	-0,4 ± 0,5	-0,2 ± 0,45	-0,2 ± 0,45
Pals Ly	0	0	-0,2 ± 0,45	0
MZ S	0,33 ± 0,52	0,4 ± 0,55	0	0,2 ± 0,45
MZ Ly	-0,17 ± 0,41	0	-0,4 ± 0,55	0
Fol N	0	0,4 ± 0,55	0,2 ± 0,45 **	0,6 ± 0,89
Fol Ly	0	0	-0,2 ± 0,45	0
Fol GC	0	0	0	0
Red S	-0,17 ± 0,41	-0,2 ± 0,45	0,2 ± 0,45	0,2 ± 0,45
Red Ly	0	0,2 ± 0,45	0	0
Red HC	0 ± 1,41	2,2 ± 1,3	1,4 ± 1,14	2,6 ± 0,89 *

* p<0,05; ** p<0,01 (u poređenju sa kontrolom). Vrednosti histopatoloških parametara prikazane su kao srednja vrednost ± standardna devijacija. MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + 0,09 x 10⁹ ćelije/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + 0,18 x 10⁹ ćelije/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + 0,36 x 10⁹ ćelije/ml). SFN - sulforafan; PA-MSHA - inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*. Površina preska na kojoj je uočljiv PALS (Pals S), broj uočljivih PALS-a (Pals N), gustina Ly u PALS-u (Pals Ly), površina preseka na kojoj je uočljiva MZ (MZ S), gustina Ly u MZ (MZ Ly), broj LF (Fol N), Gustina Ly u LF (Fol Ly), prisustvo germinativnog centra u LF (Fol GC), površina preseka na kojoj je uočljiva crvena pulpa (Red S), gustina Ly u crvenoj pulpi (Red Ly), gustina HC u crvenoj pulpi (Red HC)

Slika 57 prikazuje histološku strukturu slezina mužjaka pacova u kontrolnoj i tretiranim grupama. U beloj pulpi, parametri koji su ocenjivani za PALS i MZ nisu pokazali značajne razlike. Međutim, značajne promene su primećene pri procenjivanju parametara vezanih za LF (Slika 57 A1-J1). Broj LF bio je jedini kriterijum koji je značajno promenjen u beloj pulpi slezine, i to u MIX 2 grupi u kojoj je broj LF bio značajno veći nego u kontroli (Slika 57 A1, I1). Nije bilo drugih značajnih razlika u parametrima bele pulpe pri poređenju tretiranih grupa sa kontrolnom grupom, kao ni između samih tretiranih grupa (Slika 57 A1-J1). U crvenoj pulpi slezine mužjaka pacova značajna promena uočena je u gustini HC, koja je bila veća u MIX 3 grupi u odnosu na kontrolu (Slika 57 A2, J2). Nije bilo značajnih razlika u ostalim kriterijumima procenjivanim u crvenoj pulpi kod bilo koje druge tretirane grupe u poređenju sa kontrolom (Slika 57 A2-J2), kao ni između ostalih tretiranih grupa (Slika 57 B2-J2).



Slika 57. Reprezentativne fotomikrografije preseka tkiva slezine mužjaka pacova iz kontrolne grupe (A1, A2) i tretiranih grupa SFN 1 (B1, B2), SFN 2 (C1, C2), SFN 3 (D1, D2), PA-MSHA 1 (E1, E2), PA-MSHA 2 (F1, F2), PA-MSHA 3 (G1, G2), MIX 1 (H1, H2), MIX 2 (I1, I2) i MIX 3 (J1, J2)

Preseci tkiva obojeni hematoksilinom/eozinom posmatrane pod niskim uvećanjem (4x) (A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1, I1, J1) (bar: 200 μ m) i visokim uvećanjem (40x) (A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2, H2, I2, J2) (bar: 20 μ m). SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m./dan), SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m./dan), SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m./dan); PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + $0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + $0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + $0,36 \times 10^9$ ćelija/ml)

Tabele 70-72 prikazuju ocene za parametre procenjene na presecima tkiva slezine ženki pacova iz kontrolne i tretiranih grupa.

Tabela 70. Uticaj rastućih doza sulforafana na ocene procenjivanih parametara na presecima tkiva slezine ženki pacova nakon 28 dana tretmana

Parametar	Kontrola	SFN 1	SFN 2	SFN 3
Pals S	0	0	0	0
Pals N	- 0,17 ± 0,41	0	-0,5 ± 0,55	-0,5 ± 0,55
Pals Ly	0	0	0 ± 0,45	-0,25 ± 0,45
MZ S	0	0,25 ± 0,5	-0,5 ± 0,55	-0,25 ± 0,45
MZ Ly	0	-0,25 ± 0,5	-0,25 ± 0,45	0
Fol N	0,5 ± 0,55	0,5 ± 0,58	0,25 ± 0,55	0,5 ± 0,55
Fol Ly	0	0	-0,5 ± 0,89	0
Fol GC	0	0	0	0
Red S	0,17± 0,41	0,5 ± 0,58	1,25 ± 0,71	0,75 ± 0,89
Red Ly	0	0	0	0
Red HC	1,50 ± 1,22	2,25 ± 0,96	1,5 ± 1,3	2,75 ± 1,3

Vrednosti praćenih histoloških parametara prikazane su kao srednja vrednost ± standardna devijacija. SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m./dan); SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m./dan); SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m./dan). Površina preska na kojoj je uočljiv PALS (Pals S), broj uočljivih PALS-a (Pals N), gustina Ly u PALS-u (Pals Ly), površina preseka na kojoj je uočljiva MZ (MZ S), gustina Ly u MZ (MZ Ly), broj LF (Fol N), Gustina Ly u LF (Fol Ly), prisustvo germinativnog centra u LF (Fol GC), površina preseka na kojoj je uočljiva crvena pulpa (Red S), gustina Ly u crvenoj pulpi (Red Ly), gustina HC u crvenoj pulpi (Red HC)

Tabela 71. Uticaj rastućih doza inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na ocene procenjivanih parametara na presecima tkiva slezine ženki pacova nakon 28 dana tretmana

Parametar	Kontrola	PA-MSHA 1	PA-MSHA 2	PA-MSHA 3
Pals S	0	0	0	0
Pals N	-0,17 ± 0,41	-0,5 ± 0,55	0	-0,25 ± 0,45
Pals Ly	0	-0,25 ± 0,45	-0,5 ± 0,89	0
MZ S	0	0,25 ± 0,45	0,5 ± 0,55	0
MZ Ly	0	0	0,25 ± 0,45	0,25 ± 0,45
Fol N	0,5 ± 0,55	0,25 ± 0,45	0,5 ± 0,55	0,75 ± 0,55
Fol Ly	0	0	0	0
Fol GC	0	0	0,25 ± 0,45	0,25 ± 0,55
Red S	0,17± 0,41	0,25 ± 0,45	-0,25 ± 0,45	0,5 ± 0,55
Red Ly	0	0	0	0,25 ± 0,45
Red HC	1,50 ± 1,22	2,5 ± 0,89	0,25 ± 2,05	1,75 ± 2,3

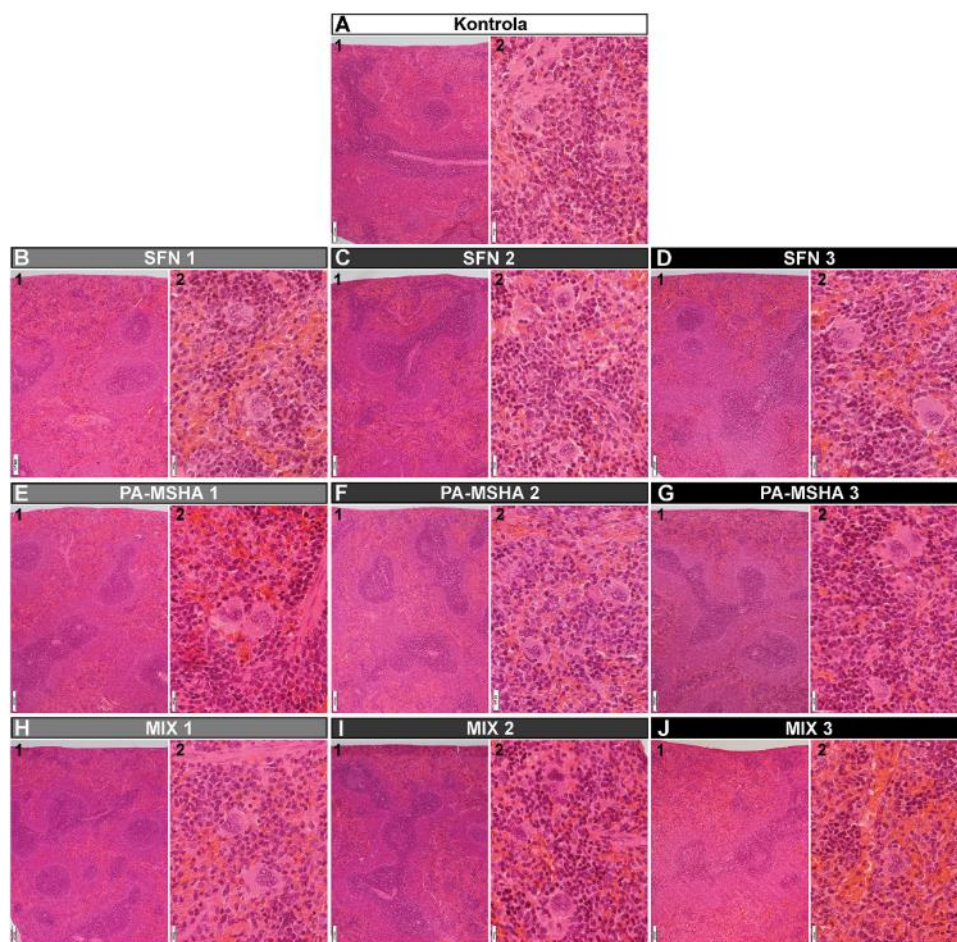
Vrednosti histopatoloških parametara prikazane su kao srednja vrednost ± standardna devijacija. PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,09 \times 10^9$ ćelije/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,18 \times 10^9$ ćelije/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,36 \times 10^9$ ćelije/ml). Površina preska na kojoj je uočljiv PALS (Pals S), broj uočljivih PALS-a (Pals N), gustina Ly u PALS-u (Pals Ly), površina preseka na kojoj je uočljiva MZ (MZ S), gustina Ly u MZ (MZ Ly), broj LF (Fol N), Gustina Ly u LF (Fol Ly), prisustvo germinativnog centra u LF (Fol GC), površina preseka na kojoj je uočljiva crvena pulpa (Red S), gustina Ly u crvenoj pulpi (Red Ly), gustina HC u crvenoj pulpi (Red HC)

Tabela 72. Uticaj kombinovane primene rastućih doza sulforafana i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na ocene procenjivanih parametara na presecima tkiva slezine ženki pacova nakon 28 dana tretmana

Parametar	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3
Pals S	0	0	0	0
Pals N	-0,17 ± 0,41	-0,25 ± 0,45	0	-0,25 ± 0,55
Pals Ly	0	0	-0,25 ± 0,5	-0,25 ± 0,45
MZ S	0	-0,25 ± 0,45	0,25 ± 0,5	-0,5 ± 0,55
MZ Ly	0	0	0	-0,25 ± 0,45
Fol N	0,5 ± 0,55	1	0,75 ± 0,5	0,5 ± 0,55
Fol Ly	0	0	0	-0,25 ± 0,45
Fol GC	0	0 ± 0,45	0,5 ± 0,58	0,5 ± 0,55
Red S	0,17 ± 0,41	0,5 ± 0,55	0	0,75 ± 0,84
Red Ly	0	0	0	0
Red HC	1,50 ± 1,22	2,75 ± 0,45	3	1 ± 2,17

Vrednosti histopatoloških parametara prikazane su kao srednja vrednost ± standardna devijacija. MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + 0,09 x 10⁹ ćelije/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + 0,18 x 10⁹ ćelije/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + 0,36 x 10⁹ ćelije/ml). SFN - sulforafan; PA-MSHA - *inaktivisana bakterija Pseudomonas aeruginosa*.. Površina preska na kojoj je uočljiv PALS (Pals S), broj uočljivih PALS-a (Pals N), gustina Ly u PALS-u (Pals Ly), površina preseka na kojoj je uočljiva MZ (MZ S), gustina Ly u MZ (MZ Ly), broj LF (Fol N), Gustina Ly u LF (Fol Ly), prisustvo germinativnog centra u LF (Fol GC), površina preseka na kojoj je uočljiva crvena pulpa (Red S), gustina Ly u crvenoj pulpi (Red Ly), gustina HC u crvenoj pulpi (Red HC)

Histološka građa slezina ženki pacova prikazana je na Slici 58. U beloj pulpi nisu uočene značajne promene u tretiranim grupama u odnosu na kontrolu za bilo koji praćeni parametar (Slika 58 A1-J1). Takođe, nisu primećene značajne promene u parametrima procenjivanim za crvenu pulpu slezine ženki pacova u tretiranim grupama u odnosu na kontrolu (Slika 58 A2-J2).



Slika 58. Reprzentativne fotomikrografije preseka tkiva slezine ženki pacova iz kontrolne grupe (A1, A2) i tretiranih grupa SFN 1 (B1, B2), SFN 2 (C1, C2), SFN 3 (D1, D2), PA-MSHA 1 (E1, E2), PA-MSHA 2 (F1, F2), PA-MSHA 3 (G1, G2), MIX 1 (H1, H2), MIX 2 (I1, I2) i MIX 3 (J1, J2)

Preseci tkiva obojeni hematoksilinom/eozinom posmatrane pod niskim uvećanjem (4x) (A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1, I1, J1) (bar: 200 μ m) i visokim uvećanjem (40x) (A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2, H2, I2, J2) (bar: 20 μ m). SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m./dan), SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m./dan), SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m./dan); PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + $0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + $0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + $0,36 \times 10^9$ ćelija/ml)

Osnovna histološka analiza timusa eksperimentalnih životinja oba pola nije pokazala razlike u histološkoj građi ovog organa između kontrolnih i tretiranih grupa. Na presecima timusa mužjaka i ženki pacova nije učeno značajno prisustvo amiloida, apoptoze limfocita, atrofije, cista, hemoragija, hiperplazije epitelnih ćelija, inflamacije, znakova involucije, mineralizacije tkiva, nekroze limfocita i pigmenata ni u jednoj eksperimentalnoj grupi. Timusi svih eksperimentalnih životinja su pokazivali tipičnu histološku građu. Lobusi su bili okruženi tankom vezivnotkivnom kapsulom, od koje su se odvajale fine vezivnotkivne septe koje su delile parenhim na mnoštvo lobulusa. Na periferiji lobulusa bila je prisutna izrazito bazofilna zona (kora) sastavljena od mnoštva sitnih, zbijenih limfocita, dok je centralni položaj zauzimala znatno manje bazofilna zona (srž). U srži je bio zastupljen manji broj limfocita srednje veličine. Timusna telašca kao i epitelioretikularne ćelije bili su slabo uočljivi u timusima svih eksperimentalnih životinja (Prilogu 1, Slike 3 i 4).

5. DISKUSIJA

Incidenca malignih tumora u svetu je u stalnom rastu i, prema proceni SZO iz 2018. godine, tendencija je da maligni tumori postanu vodeći uzrok smrti u predstojećim godinama (1). Revolucionarno otkriće inhibitornih receptora na T limfocitima (imunske kontrolne tačke) i monoklonskih antitela koja blokiraju njih ili njihove ligande omogućilo je stimulaciju antitumorskog imunskog odgovora pacijenata sa uznapredovanim tumorima i umnogome poboljšala njihove šanse za preživljavanje. Međutim i pored efikasnosti ove terapije, ona ima i brojna ograničenja pa se smatra da će primena dva inhibitora u kombinaciji ili jednog u kombinaciji sa nekim drugim oblikom terapije biti neophodna da bi se postigao visok stepen uspešnosti lečenja (4-6). Brojni molekuli se ispituju, a među njima su i SFN i PA-MSHA koji su predmet istraživanja ove doktorske disertacije (9, 10).

Sulforafan je hemijsko jedinjenje prisutno u kupusastom povrću porodice *Brassicaceae* u obliku prekursora glukorafanina. Glukorafanin oslobađa pomenuti izotiocijanat u procesu hidrolize posredstvom enzima mirozinaze. Posедуje imunomodulatorne karakteristike, odnosno mogućnost inhibicije prekomernog odgovora imunskog sistema aktivacijom Nrf2 signalnog puta i posledično inhibicijom NF- κ B (142). Dodatno, SFN inhibira NLRP3 inflamazom i smanjuje sekreciju pro-inflamatornih citokina (143), ili u hroničnom inflamatornom okruženju dovodi do nishodne regulacije markera sazrevanja dendritskih ćelija (DC) i nastanak DC koje će stimulisati sekreciju IL-9 i IL-13 od strane T ćelija, a povećava generisanje onih koje će stimulisati sekreciju IL-10 (144). Pored toga, literaturni podaci ukazuju na postojanje antitumorskih, neuro i kardioprotektivnih svojstva SFN koja su posredovana dejstvom na imunski sistem (26). Svi ovi efekti uočeni su u studijama u kojima je korišćen standardizovani ekstrakt SFN biljnog porekla, dok se sintetski dobijen SFN, za sada, nalazi u fazi istraživanja. S druge strane, PA-MSHA stimuliše imunski odgovor i oslobađanje pro-inflamatornih citokina rane i kasne faze inflamacije (113). Dodatno, literaturni podaci ukazuju na interakcije između PA-MSHA i makrofaga, pri čemu PA-MSHA tretman doprinosi formiranju pro-inflamatornih M1 makrofaga (87) i održavanju balansa između urođenog i stečenog imunskog odgovora (145). Zbog toga je primena PA-MSHA, kao adjuvantna antitumorska terapija, predmet sve većeg broja istraživanja (74).

S obzirom na različite mehanizme kojima SFN i PA-MSHA regulišu imunski odgovor, opravdano je pretpostaviti da bi njihova kombinovana primena imala dvojni efekat, koji može biti od koristi u terapiji brojnih bolesti posredovanih imunskim odgovorom. Međutim, bezbednost njihove pojedinačne primene i toksični potencijali nedovoljno su razjašnjeni, dok je na osnovu dostupnih podataka ispitivanje SFN i PA-MSHA kombinacije prvi put sprovedeno u okviru ove doktorske disertacije.

5.1. Toksičnost sulforafana

5.1.1. *In silico* analiza

U prvom koraku ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije sprovedena je analiza odnosa struktura-dejstvo koja omogućava predviđanje toksičnih efekata na osnovu hemijske strukture ispitivane supstance (146). Korišćenjem *Derek Nexus* softvera utvrđeno je da molekul SFN sadrži dve hemijske grupe, toksofore, koje mogu dovesti do preosetljivosti kože kod ljudi ili izazvati oštećenje hromozoma i to: izocijanat i izotiocijanat. Fluorescein izotiocijanat je poznati iritans koji se koristi za kreiranje modela kontaktnog dermatitisa, upravo zbog postojanja izotiocijanatne grupe u hemijskoj strukturi

(147, 148). Pored toga, pokazano je da i drugi izoziocijanati, kao što su feniletil i etil izotiocijanat predstavljaju jake alergene i mogu izazvati preosetljivost kože (149, 150) što je u skladu sa rezultatima ovog istraživanja. Takođe, postoje literaturni podaci koji pokazuju da se oštećenje hromozoma može dovesti u vezu sa izocijantnom grupom SFN. Panwar i sar. (2014) pokazali su da metil izocijanat utiče na ćelijski ciklus i izaziva promene u nivoima ciklina A, ciklina E, CDK2, kao i prekomernu ekspresiju proteina uključenih u formiranje mitotičkog vretena, Aurora A/B, centrozomalnog pericentrina, gubitka Pot1a i hromozomskih aberacija čime se pokreće proces karcinogeneze u jetri (151).

Da bi se dalje razumela veza između SFN i predviđenih štetnih ishoda, izvršena su dodatna *in silico* ispitivanja mehanizam toksičnosti. Na osnovu dostupnih podataka u CTD bazi utvrđeno je da SFN intereaguje sa preko 1900 gena, među kojima je najveći broj interakcija identifikovano između SFN i gena/proteina uključenih u proces oksidativne zaštite i/ili inflamacije. Tako na primer, SFN povećava ekspresiju, produkciju i aktivnost Nrf2, NQO1, kao i HO-1 proteina odgovornih za održavanje oksidativnog balansa u ćelijama (152, 153). Opisani su i drugi Nrf2-zavisni mehanizmi kojima SFN može ublažiti oksidativni stres, kao na primer, aktivacija lizozom-zavisnog transkripcionog programa i to, aktivacija transkripcionog faktora EB (TFEB) koji reguliše autofagiju i funkcije lizozoma. Pri blagom porastu nivoa slobodnih radikala u ćeliji, SFN stimuliše translokaciju TFEB u nukleus koji dalje pojačava ekspresiju gena uključenih u biogenezu autofagozoma i lizozoma čime je olakšano uklanjanje oštećenih mitohondrija (154). Dodatno, aktivacija Nrf2 dovodi se u vezu i sa antiinflamatornim karakteristikama SFN (155), koje su, takođe, posredovane smanjenom ekspresijom, produkcijom i aktivnošću IL1 β pro-inflamatornog citokina, kao i IFN γ , dok je uticaj SFN na TNF α dvojak. Shang i sar. (2017) tretirali su HL-60 ćelijsku liniju 8 μ M SFN što je dovelo do pojačane ekspresije *TNF* i stimulacije TNF α -zavisnih molekularnih puteva, uključujući apoptozu, što predstavlja pozitivan efekat (156). S druge strane, Moon i sar. (2021) pokazali su u studiji sprovedenoj na miševima da SFN inhibira diferencijaciju B limfocita i produkciju pro-inflamatornih citokina, uključujući TNF α , čime ostvaruje inflamatorni odgovor u reumatoidnom artritisu (157). Međutim, prekomerna ekspresija *TNF* dovodi se u vezu sa brojnim patološkim stanjima kao što su, na primer: astma (158), psorijaza (159) i insulinska rezistencija (160). Obzirom da TNF α igra značajnu ulogu u imunskom odgovoru (161), može se pretpostaviti da nedovoljna produkcija TNF α negativno utiče na aktivaciju imunskog sistema posebno u stanjima kada je narušena njegova funkcija.

Sulforafan je imunomodulator što znači da prioritentno intereaguje sa genima/proteinima uključenim u regulaciju imunskog odgovora, apoptoze i oksido-redukcije (*Cytoscape* CytoHubba; *Cytoscape* ClueGO + CluePedia). Pored toga, funkcija CTD baze, *CTD Tetramers* doprinela je formiranju veze između SFN i inflamacije i razumevanju mehanizama imunskih odgovora posredovanih SFN i to integracijom ručno kreiranih interakcija zasnovanih na literaturi. Cilj ove funkcije CTD baze je formiranje „CGPD-tetramer” bloka koji se sastoji se od četiri jedinice koje povezuju unetu hemikaliju (SFN), sa intereagujućim genom/ima, zatim fenotipom i bolešću kao krajnjim ishodom (122). Otkriveno je ukupno 215 tetramera povezanih sa SFN i inflamacijom sa preko 40 gena i 48 fenotipa. Dobijeni rezultati pokazuju da SFN utiče na migraciju ćelija imunskog sistema, uključujući migraciju leukocita, kao i na humoralni imunski odgovor posredovan antitelima.

Efekti SFN na ćelije i funkcionisanje imunskog sistema, detaljno su proučavani pri čemu je pokazano da SFN ostvaruje hemio-preventivna dejstva održavanjem redoks balansa, homeostaze u ćeliji i stimulacijom imunskog odgovora. Kao glavni mehanizam dejstva,

izdvaja se i indukcija Nrf2 i inhibicija NFκB što dovodi do aktivacije HO-1, glutationa i lučenja metaboličkih enzima druge faze čija je funkcija povećanje hidrofilnosti i eliminacije ksenobiotika. S druge strane, sekrecija enzima prve faze metabolizma, uključenih u reakcije oksidacije, redukcije i hidrolize, kao i histon deacetilaza ostaju inhibirani (26). Tako su, na primer, Shen i sar. (2021) pokazali da SFN poboljšava citotoksičnost CAR-T ćelija snižavanjem ekspresije PD-1/PD-L1 i pojačavanjem razgradnje PD-L1 što posledično sprečava inhibiciju CAR-T ćelija, a povećava lučenje pro-inflamatornih citokina (162). Osim toga, uočeno je da SFN efikasno sprečava pojavu metastaza i to stimulacijom ćelijskog imunskog odgovora kroz povećanje ekspresije IL-2 i IFNγ i smanjenje produkcije proinflamatornih citokina: IL-1β, IL-6, TNFα i GM-CSF (163). Međutim, promena imunskih procesa, i/ili narušavanje balansa između pro- i antiinflamatornih reakcija u organizmu u osnovi je brojnih bolesti. Tako, psorijaza predstavlja imunološko oboljenje kože gde sekrecija IL-17 citokina od strane Th17 pomoćničkih ćelija, igra važnu ulogu. Vezivanje IL-17 za IL-17 receptor na keratinocitima, dovodi do proliferacije Th17 ćelija i daljeg oslobađanja upalnih medijatora i hemokina (164, 165). Slično tome, IL-17 i IL-22 se navode kao važni činioci u poremećaju barijerne funkcije kože i razvoju atopijskog dermatitisa, još jedne česte inflamatorne bolesti kože (166). Dakle, iako se brojna terapijska svojstva SFN povezuju sa njegovim antiinflamatornim svojstvima, neadekvatna primena SFN može poremetiti homeostazu imunskog odgovora i doprineti razvoju inflamatornih bolesti. Zbog toga je potrebno detaljno razjasniti uticaj SFN na ćelije imunskog sistema, produkciju citokina i odrediti njegovu optimalnu dozu.

5.1.1.1. Potencijalni toksični efekat sulforafana na nivou gena

Budući da brojna ispitivanja pokazuju citotoksični i hemio-protektivni potencijal SFN, *in silico* analiza je dalje korišćena za predviđanje štetnih efekata SFN kod pacijenata obolelih od karcinoma kolona, pankreasa i prostate. Kolorektalni karcinom, kao i karcinom prostate često su posledica hroničnih upalnih procesa zbog čega primena imunomodulišućih jedinjenja, kao što je SFN može biti od interesa. S druge strane, karcinom pankreasa smatra se najsmrtonosnijim malignim oboljenjem ukazujući na pojačanu potrebu za pronalaskom efikasne i bezbedne terapije. Geni koji interaguju sa SFN, što je dobijeno u korišćenju CTD baze upoređeni su sa DEG kolorektalnog karcinoma, pankreasa i prostate sa ciljem pronalaženja zajedničkih gena, odnosno gena na koje može uticati SFN, a čija je ekspresija izmenjena u tkivu pomenutih malignih tumora.

Identifikovano je 99 SFN-intereagujućih gena čija je ekspresija izmenjena u karcinomu kolona i to 66 povećano i 33 smanjeno eksprimiranih. Pored toga, 12 DEG u karcinomu pankreasa (8 povećano i 4 smanjeno eksprimiranih gena), i 21 gen u karcinomu prostate (10 povećano i 11 smanjeno eksprimiranih) dovode se u vezu sa SFN. Ovi geni dalje su korišćeni u analizi genske ontologije kako bi se detektovala različita oboljenja regulisana datim genima.

Sulforafan intereaguje sa *TIMP1* genom, uključenim u proces formiranja i remodelovanja matriksa tokom degradacije ekstracelularnog matriksa, dok inhibiranjem metaloproteinaza pospešuje metastatski potencijal tumora (167). Hansson i sar. (2009) ukazali su na vezu između nivoa *TIMP1* u serumu i hipertrofije leve pretkomore praćene oslabljenom srčanom funkcijom. Oni su posmatrali 1016 osoba bez istorije srčanih bolesti i zaključili da povećani nivoi *TIMP1* u serumu mogu biti rani znak remodeliranja ekstracelularnog matriksa srca (168). Slično tome, u kohortnoj studiji kod grupe ispitanika muškog pola koja je podvrgnuta koronarnoj angiografiji, nivo *TIMP1* u plazmi prepoznat je kao prediktivni biomarker rizika od kardiovaskularnih bolesti i infarkta miokarda (169, 170).

Prema sprovedenom istraživanju ove doktorske disertacije, SFN utiče na ekspresiju *TIMP1* koji zajedno sa *SPP1* i *CCL20* aktivira IL-10 signalni put uključen u patogenezu plućne fibroze (Slika 5). Aurora Kinaza A (*AURKA*) je član porodice serin/treonin kinaza uključenih u ulazak ćelije u mitozu, formiranje bipolarnog vretena, kontrolu sazrevanja centrozoma i segregaciju tokom mitoze. Studije su pokazale da pojačana ekspresija *AURKA* može biti loš prognostički marker za pacijente obolele od kolorektalnog karcinoma (171), ili doprineti progresiji adenoma (172). Osim toga, Jiang i sar. (2021) primetili su da prekomerna ekspresija *AURKA* u fibroblastima bubrega podstiče proces fibroze i time pogoršava funkciju i stanje hronično obolelih bubrega (173). Naši rezultati pokazali su da SFN remeti ekspresiju *NEK2* i *CDK1* u ćelijama karcinoma kolona, čime dovodi do aktivacije *AURKA* od strane TPX2 signalnog puta (Slika 5). Osim toga, sugerisano je da SFN može uticati na *SOX9*, gen koji igra ulogu u regulaciji transkripcije *RUNX2* zajedno sa *CDK1*. Transkripcioni faktor uključen u regulaciju osteogene diferencijacije (engl. *Runt-related transcription factor 2*, *RUNX2*) je osteogeni transkripcioni faktor, odnosno gen od značaja za formiranje kostiju. Međutim, u kardiovaskularnom sistemu, podstiče osteogenu transdiferencijaciju glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova i ekspresiju pro-inflamatornih citokina, što se dovodi u vezu sa aterosklerozom i drugim vaskularnim komplikacijama (174). Takođe, detektovan je povećan nivo *RUNX2* i osteopontina kod pacijenata sa simptomatskim arteriosklerotskim oboljenjem, dok je nivo osteokalcina smanjen (175). Stoga, eventualno uvođenje SFN kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom i pridruženom istorijom kardiovaskularnih bolesti treba da bude pažljivo i detaljno razmotreno. Dalje, ekspresija gena uključenog u proces diferencijacije belih i mrkih adipocita, *PLAC8*, snižena je u tkivu kolorektalnog karcinoma i mogla bi biti dodatno redukovana dejstvom SFN, prema rezultatima naših istraživanja (Slika 5). Dostupni literaturni podaci pokazuju da inhibicija *PLAC8* može dovesti do redistribucije masnog tkiva i doprineti razvoju gojaznosti. Kod miševa deficijentnih za *PLAC8*, uočeno je povećano skladištenje masti. Predloženi mehanizam se oslanja na inhibiciju termogeneze usled inhibicije transkripcije *C/EBP β* gena (176). U drugom istraživanju, autori su primetili da su miševi sa suprimiranim *PLAC8* podložniji razvoju dijabetesa tipa 2 povezanog sa gojaznošću (177). Pored toga, ekspresija *PLAC8* važna je za regulisanje odgovora Th1 ćelija i citotoksičnih CD8⁺T ćelija, koji je posredovan sekrecijom IFN γ u borbi protiv intracelularnih patogena kao što je virus influence A (178). Budući da gojaznost može biti uzrok brojnih patoloških stanja, uključujući i neke vrste malignih tumora, neophodno je dalje razjasniti vezu sa SFN kroz *in vitro* i *in vivo* studije.

Dalje, u karcinomu pankreasa, identifikovano je samo 12 gena čija je ekspresija izmenjena, a na koje deluje SFN. Ovi geni, uključeni su u regulaciju 2 molekularna puta i to: MET aktivirani PTK2 signalni put i Formiranje ekstracelularnog matriksa posredstvom proteoglikana. Pojačana ekspresija *LUM* gena identifikovana je u karcinomu dojke, neuroendokrinom, utero-cervikalnom, kolorektalnom, ali i karcinomu pankreasa i dovodi se u vezu sa progresijom i invazijom bolesti (179). Jedina, do sada, objašnjena veza između SFN i *LUM*, uočena je u studiji sprovedenoj na humanim ćelijama karcinoma jetre (HepG2) koje su tretirane 8 μ M SFN tokom 24 h. Sulforafan je doveo do smanjene ekspresije *LUM* gena što ukazuje na antitumorski efekat (180). S druge strane, u istoj studiji, SFN je doprineo povećanoj ekspresiji *HKDC1* gena koja se dovodi u vezu sa lošom prognozom u hepatocelularnom karcinomu (180). Međutim, efekat SFN na pomenute gene u tkivu karcinoma pankreasa još uvek nije razjašnjen. Stoga, u zavisnosti od vrste interakcije na nivou gena, primena SFN kod pacijenata obolelih od karcinoma pankreasa može imati pozitivan ili negativan uticaj na progresiju bolesti. Pored toga, uticajem na *HPGD*, SFN reguliše formiranje ekstracelularnog matriksa posredstvom proteoglikana. Pojačana ekspresija *HPGD* stimuliše stvaranje prostaglandina E2 koji se dovodi u vezu sa

rezistencijom tumora na radioterapiju i daljom progresijom bolesti (181). Inhibicijom ovog gena, SFN može doprineti boljem odgovoru na terapiju.

Konačno, analizom ontologije SFN-intereagujućih gena čija je ekspresija izmenjena u karcinomu prostate izdvojili su sledeći putevi: Cirkardijalna regulacija u uslovima fizičkog napora, Kontrakcija glatke muskulature i Endotelin-regulisani putevi. Interakcijom sa *TMEFF2*, *ACTG2* i *CNN1*, SFN reguliše formiranje i funkcije endotela. Tako su Hy i sar. (2019) pokazali da SFN inhibira ekspresiju *TMEFF2* gena, a stimuliše *ACTG2* i *CNN1* (182). Iako *TMEFF2* ostvaruje antiproliferativne efekte u tumorskom tkivu prostate, tumorske ćelije imaju sposobnost da izbegnu androgenima-posredovanu modulaciju endotela, smanje ekspresiju *TMEFF2*, a povećavaju svoj maligni potencijal (183). Dodatno, smanjena ekspresija *ACTG2* i *CNN1* povezana je sa povećanjem rizika od nastanka metastaza na kostima, što se smatra najopasnijom komplikacijom karcinoma prostate. *ACTG2* i *CNN1* intereaguju sa proteoglikanima i receptorima ekstracelularnog matriksa, stimulišući tako motilitet tumorskih ćelija (184).

Iz svega priloženog može se pretpostaviti da genomski zapis pacijenata obolelih od različitih vrsta malignih tumora, kao i uticaj SFN na gene, može biti važan faktor u razmatranju profila rizika i koristi od primene SFN.

5.1.2. *In vitro* analiza

U ovoj doktorskoj disertaciji uočeno je da je SFN ispoljava citotoksičan efekat prema ćelijama kolorektalnog karcinoma kod kojih je *p53* gen mutiran (HT-29), ili *wild type* (HCT-116). Dobijeni rezultati ukazuju na veću osetljivost HCT-116 ćelija, što bi moglo da ukazuje na moguću ulogu *p53* tumor supresornog gena u regulaciji antitumorskog odgovora SFN. Dodatno, potencijal SFN da izazove apoptozu tumorskih ćelija bio je vremenski-zavistan, sa značajno većim procentom apoptotičnih HT-29 ćelija nakon 48 h tretmana. Takođe je pokazano da kod SFN-tretiranih ćelija dolazi do zastoja ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa. U HT-29 tretiranim ćelijama, detektovan je i određen broj ćelija u sub-G1 fazi, (Slika 14), odnosno određen broj apoptotičkih ćelija sa fragmentisanom DNK što je karakteristika kasne faze procesa apoptoze pod dejstvom endonukleaza (185). Prethodnim istraživanjima je pokazano da pored ćelija kolorektalnog karcinoma (186), SFN inhibira rast i razvoj ćelija tumora želuca (BGC-823 i MGC-803) i prostate (PC-3 i LNCaP) istim mehanizmima (187, 188). Autori su objasnili da SFN zaustavlja ćelijsku deobu u S fazi ćelijskog ciklusa i to aktivirajući *p53/p21* signalni put. Dodatno, SFN stimuliše apoptozu tumorskih ćelija putem *p53*-indukovanog oslobađanja kaspaze 3 (187, 188). Međutim, antitumorski efekat SFN pokazan na HT-29 ćelijama ukazuje na sposobnost SFN da aktivira i druge mehanizme citotoksičnosti, nezavisne od *p53* ekspresije. Tako su, Rudolf i Cervinka (2011) uočili da kod HCT-116 ćelija SFN tretman dovodi do pojačane ekspresije c-Jun N-terminalne kinaze (c-JUN) koja posreduje u permeabilizaciji lizozomske membrane i katepsinom stimulisanom oslobađanju Bid (engl. *BH3 Interacting Domain Death Agonist*). Bid, dalje, deluje na regulatorne proteine apoptoze, Bax i Bcl-2, istovremeno promovišući translokaciju mitohondrijalnog citohroma c što dovodi do programirane ćelijske smrti (189). Zbog toga je u ovoj doktorskoj disertaciji praćen i uticaj SFN na promenu (smanjenje) membranskog potencijala mitohondrija, pri čemu je uočeno značajno smanjenje membranskog potencijala u HT-29 nakon 24 i 48 h tretmana SFN, dok je u HCT-116 ćelijama smanjenje zabeleženo nakon 48 h tretmana (Slika 16). Smanjenje membranskog potencijala ukazuju na moguću aktivaciju mitohondrijalnog puta apoptoze čiji je ključni događaj oslobađanje citohroma c (190). Nakon oslobađanja iz mitohondrija citohrom c prelazi u citoplazmu gde aktivira kaskadnu reakciju kaspaza unutrašnjeg puta apoptoze, ili stimuliše signalne puteve spoljašnjeg

apoptotskog puta (191). Međutim, efluks citohroma c iz mitohondrija ključan je i za pokretanje inflamatornog procesa i dovodi se u vezu sa inflamatornim bolestima kože kao što su psorijaza i psorijatični artritis. Tako su na primer, kod pacijenata sa psorijazom primećeni viši nivoi citohroma c u serumu i mitohondrijama u poređenju sa pacijentima sa zdravom kožom (192). Smanjenje mitohondrijalnog membranog potencijala i oslobađanje citohroma c može objasniti *in silico* rezultate, dobijene u ovoj doktorskoj disertaciji, koji ukazuju na vezu između SFN i efekata na koži. Konačno, interesantno je pomenuti da SFN smanjuje nivo ukupnih ROS u obe ispitivane ćelijske linije, ali je efekat na nivou HT-29 bio izraženiji i nakon 24 i 48 h tretmana (Slika 17). Slično tome, studija sprovedena od strane Sah i sar. (2024) ispitala je uticaj primene 5 μ M i 10 μ M SFN tokom 24 h na IL-1 β - indukovanu aktivaciju IL-6 i signalne puteve MAPK/AP-1 i STAT 3 u HT-29 ćelijama pri čemu je pokazano da SFN tretman smanjuje ekspresiju IL-6 i oksidativni stres ograničavanjem proizvodnje ROS. Posledično, dolazi do promene aktivnosti MAPK/AP-1 puta i inhibicije proliferacije tumorskih ćelija (193). Suprotno tome, primena 40 μ M SFN tokom 24 h u dve ćelijske linije nesitnoćelijskog karcinoma pluća dovela je do pojačane produkcije ROS, zaustavljanja ćelijske deobe u S fazi i oštećenja DNK. Na ovaj način, SFN stimuliše apoptozu tumorskih ćelija (194). Stoga, može se pretpostaviti da je efekat SFN na produkciju ROS u tumorskim ćelijama dozno-zavistan, pri čemu niže koncentracije dovode do smanjenja generisanja slobodnih radikala, a primena SFN u višim koncentracijama može doprineti oksidativnom stresu u tretiranim ćelijama.

Dodatno, u ovoj doktorskoj disertaciji pokazano je da tretman HT-29 i HCT-116 ćelija SFN dovodi do značajnog smanjenja proteinske ekspresije fosforilisane, aktivne forme c-Jun N-terminalne kinaze (JNK), koja je uključena u različite ćelijske procese, kao što su ćelijski rast, apoptoza i inflamacija. Sulforafanom indukovano smanjenje fosforilacije JNK posledično bi moglo da inhibira NF- κ B i AP-1 signalne puteve što dovodi do sniženja ekspresije inflamatornih medijatora (iNOS, COX-2, NO, i PGE2) i proinflamatornih citokina (TNF α , IL-6, i IL-1 β) što je u saglasnosti sa dosadašnjim istraživanjima Subedi i sar. (195).

Dobijeni rezultati ispitivanja na MRC-ćelijama pokazuju selektivnost SFN prema HCT-116, ali ne i HT-29 ćelijama karcinoma kolona. Važno je napomenuti i da, dosadašnji literaturni podaci ukazuju na manju osetljivost zdravih ćelija na citotoksični potencijal SFN u *in vitro* uslovima (187), kao i da je koncentracija ta koja diktira citotoksične efekte. U ćelijama sluzokože želuca, niske koncentracije SFN (2 do 4 μ M) pokazuju citoprotektivna svojstva, dok primena viših koncentracija (8 do 32 μ M) dovodi do smrti tretiranih ćelija (196).

5.1.3. In vivo analiza

5.1.3.1. Akutna toksičnost sulforafana na modelu zebrice

Akutna toksičnost imunomodulatora ispitana je na modelu embriona zebrice (OECD test 236 – engl. *Fish Embryo Acute Toxicity Assay*, FET test). Ovaj eksperimentalni model značajan je za predviđanje toksičnosti zbog toga što omogućava određivanje toksičnih efekata u ranoj fazi razvoja embriona, zatim praćenje razvoja organa, kao i zahvaljujući tome što postoji 70% funkcionalne genske homologije između ljudi i zebrice. Pored toga, optička transparentnost embriona zebrice i visok stepen genetičke sličnosti, olakšava identifikaciju gena koji igraju važnu ulogu u procesu rasta i razvoja što je u velikoj meri doprinelo boljem razumevanju razvojnih procesa. Zebrice imaju veoma kratak ciklus reprodukcije, sazrevaju pri starosti od oko 4 meseca, a jedna ženka može da produkuje oko

100 jaja dnevno, što znači da se u laboratorijskim uslovima lako može proizvesti i nekoliko hiljada embriona dnevno i koristiti paralelno u eksperimentalnim tretmanima (197).

U ovoj studiji, embrioni zebrića su tretirani rastućim dozama SFN u cilju izračunavanja LC50 vrednosti, i analize uticaja SFN na preživljavanje, rast i razvoj embriona tokom petodnevnog tretmana. Uočeno je da štetni efekti zavise od primenjene koncentracije SFN (0,5 do 20 µg/ml). Izračunata koncentracija SFN koja je dovela do letalnog ishoda 50% tretiranih embriona zebrića iznosila je 14,2 µg/ml (LC50), što je u saglasnosti sa LC50 vrednošću dobijenom Benchmark analizom 14,8 µg/ml. Primena SFN u koncentraciji od 4 µg/ml sprečava formiranje mehura kod oko 30% embriona, dok je pri koncentraciji od 10 µg/ml ovaj efekat uočen kod svih embriona. Nekroza jetre je uočena samo pri koncentraciji SFN od 10 µg/ml. Kardiotsičnost nije uočena pri ispitivanim koncentracijama SFN. Benchmark analizom izračunate su koncentracije SFN koje dovode do pojave teratogenosti, štetnog efekta na razvoj mehura i hepatotoksičnosti i iznose 3,22 µg/ml, 3,2 µg/ml i 6,85 µg/ml, redom. Literaturni podaci pokazuju da su pozitivni efekti SFN uočeni pri koncentracijama koje su više ili niže u odnosu na koncentracije koje izazivaju štetne efekte na embrionima zebrića dobijene u ovoj doktorskoj disertaciji (198, 199). Eom i sar. (2022) su utvrdili koncentraciju SFN od 30 µM (odgovara 5,3 µg/ml) koja je pokazala antitumorski potencijal, što je niže od koncentracije koja izaziva hepatotoksičnost, a više od koncentracije za druge prućene štetne efekte, malformacije embriona i uticaj na razvoj mehura, u ovoj doktorskoj disertaciji. Neuroprotektivni efekat SFN pokazan je u koncentraciji od 25 µM (odgovara 4,43 µg/ml) u ispitivanju na zebrićama (199). Takođe, ispitivanja na ksenograft modelima zebrića sa tumorskim ćelijskim linijama mozga (U87), grlića materice (HeLa) i dojke (MDA-MB-231) pokazala su da fosfonatni analog sulforafana poseduje antitumorska svojstva u koncentraciji od 3 µM (odgovara 0,53 µg/ml), što je znatno niža koncentracija od prethodno navedenih koncentracija za SFN (38). Dodatno, i u ovoj doktorskoj disertaciji citotoksično dejstvo SFN na ćelijama kolorektalnog karcinoma (HCT-116) uočeno je pri koncentraciji nižoj od LC50 vrednosti dobijenoj na modelu embriona zebrića. Dobijeni *in vitro* rezultati pokazali su citotoksični efekat SFN u koncentracijama od 1,41 µg/ml (HCT-116) i 4,39 µg/ml (HT-29).

5.1.3.2. Subakutna toksičnost na modelu pacova

5.1.3.2.1. Unos vode, hrane, relativna masa organa i prirast telesne mase

Unos hrane i vode, a posledično i prirast telesne mase varirali su tokom trajanja eksperimenta i kod mužjaka i kod ženki pacova tretiranih rastućim dozama SFN, dok se relativna masa organa nije značajno razlikovala od kontrole. Uočeno je jedino blago uvećanje prostate, a smanjenje jetre i bubrega tretiranih mužjaka pacova. Kod ženki, unos vode značajno je varirao između tretiranih grupa, dok je, jedina statistički značajna razlika u unosu hrane između kontrole i tretmana dobijena nakon 28. dana. Dodatno, na kraju eksperimenta, uočeno je blago povećanje relativne mase pluća ženki pacova. Smanjenje telesne mase viđeno je nakon 7, 14, 21. i 28. dana tretmana kod mužjaka pacova u grupama SFN 1 i SFN 2, dok je smanjenje telesne mase kod tretiranih ženki uočeno samo u SFN 3 grupi, ali bez statističke značajnosti. Dobijeni rezultati u skladu su sa studijom sprovedenom od strane Lu i sar. (2020) koji su pokazali da SFN smanjuje telesnu masu mužjaka miševa kao i taloženje masti oko bubrega i testisa. Miševi su tretirani tokom 4 meseca, ali su rezultati uočeni već nakon mesec dana primene 1 mg/kg t.m./dan SFN (200). Slično tome, primena 10 mg/kg t.m./dan SFN tokom 3 nedelje dovodi do redukcije telesne mase tretiranih životinja (mužjaci miševa) i sprečava akumulaciju lipida u jetri (201). Takođe, uočeni su i antiobesogeni efekti SFN kada se primenjivao u dozi od 5 mg/kg t.m. na dan tokom 14 dana. Ovi efekti mogu se objasniti time što SFN pozitivno

reguliše osetljivost ćelija rezistentnih na leptin i reguliše potrošnju energije i metabolizam (43). Takođe, SFN doprinosi lipolizi, putem aktivacije hormon-senzitivne lipaze i stimulacije diferencijacije belih adipocita u mrko masno tkivo, odnosno povećanjem lipofagije putem AMPK-mTOR-ULK1 signalnog puta (44). Međutim, važno je napomenuti da su antiobesogeni efekti SFN uočeni u studijama na miševima kod kojih je prethodno indukovana gojaznost pa se efekat SFN može okarakterisati kao pozitivan. U ovoj doktorskoj disertaciji tretirani su zdravi mužjaci i ženke pacova pri čemu je zabeležen gubitak telesne mase koji se može povezati sa pojavom potencijalno štetnih kataboličkih reakcija u kojima se polisaharidi, lipidi i proteini razlažu u manje jedinice.

5.1.3.2.2. Hematološki i biohemijski parametri

Uticaj SFN na hematološke parametre je od posebnog značaja s obzirom da je toksični efekat na nivou krvnih ćelija jedan od najčešćih i najtežih neželjenih efekata citostatske terapije koji određuje njen nastavak ili prekid. Statistički značajan porast broja leukocita primećen je kod mužjaka pacova koji su bili tretiranim najvišom dozom SFN. Dodatno, iako nije dobijena statistički značajna leukopenija, uočava se smanjenje leukocita u SFN 2 grupi ali porast u SFN 3 grupi što može ukazivati na specifičan odgovor eksperimentalnih životinja u SFN 2 grupi na primenjen tretman. Prethodno je pokazano, da primena visoke doze SFN, 200 mg/kg može doprineti razvoju leukopenije kod miševa 48 sati nakon tretmana (66). Međutim, i dalje ne postoji dovoljno dokaza koji bi potvrdili potencijal SFN da izazove leukopeniju nakon akutne ili subakutne primene. Dalje, iako je u kliničkim studijama primećeno da SFN efikasno snižava povišene vrednosti limfocita prouzrokovane primenjenom antikancerogenom terapijom (202), u sprovedenoj doktorskoj disertaciji uočeno je da dovodi do statistički značajnog povećanja procenta limfocita kod mužjaka pacova u SFN 3 grupi u odnosu na kontrolu. Međutim, suprotno tome, kod ženki pacova izmeren je niži nivo limfocita u SFN 3 grupi u odnosu na SFN 1 i kontrolu, ali bez statističke značajnosti. Pored toga, polno-specifičan efekat SFN, zabeležen je kod sledećih hematoloških parametara: procenat i apsolutni broj monocita i neutrofila, procenat bazofila i ukupan broj trombocita. Na primer, procenat bazofila, kao i apsolutni broj bazofila kod mužjaka pacova bio je značajno niži u tretiranim grupama u odnosu na kontrolu, dok je kod ženki bio viši, ali bez statističke značajnosti. Dalje, promena u broju apsolutnih neutrofila kod ženki pacova bila je značajno viša u SFN 3 grupi, u odnosu na kontrolu, dok kod mužjaka nije zabeležen ovaj efekat. Iako dobijeni rezultati ukazuju na slab potencijal SFN da izazove promene na nivou ispitivanih hematoloških parametara, BMD analizom utvrđeno je da veoma niske doze SFN (0,393 mg/kg t.m./dan, 0,114 mg/kg t.m./dan, redom) mogu dovesti do 5% povećanja broja i % limfocita u krvi mužjaka pacova, a smanjenja % neutrofila (0,0105 mg/kg t.m./dan). Pored toga, doza 0,0109 mg/kg t.m. dan SFN mogla bi da dovede do 5% povećanja broja neutrofila u krvi ženki pacova. Stoga, neophodno je dalje ispitati vezu između primene SFN i leukocitarne formule u cilju potvrde dobijenih rezultata.

Dalje, ispitan je i uticaj SFN na hematološke parametre anemije, odnosno broj eritrocita, koncentraciju hemoglobina, hematokrita, gvožđa, kao i MCH, MCV, MCHC, TIBC i UIBC parametre. Pokazalo se da primena rastućih doza SFN ne dovodi do statistički značajne promene vrednosti broja eritrocita, koncentracije hemoglobina i hematokrita što je u skladu sa prethodno publikovanom studijom na miševima u kojoj je ispitan uticaj SFN na eritrocite i hemoglobin u cilju tretmana srpaste anemije (engl. *Sickle cell disease*, SCD) (15). Jedini hematološki parametar anemije čija se promena pokazala kao statistički značajna jeste MCHC i to kod ženki pacova. U SFN 1 grupi vrednost MCHC bila je statistički značajno niža u odnosu na vrednost u SFN 2 grupi. Niske vrednosti MCHC praćene niskim vrednostima gvožđa, a normalnim vrednostima ostalih parametara anemije

dovode se u vezu hipohromnom anemijom (203). Iako izmerene koncentracije gvožđa u serumu tretiranih ženki pacova nisu pokazale statistički značajnu razliku u poređenju sa kontrolom, dobijen je niži nivo gvožđa u SFN 1 i SFN 3 grupi. U serumu ženki tretiranih dozom od 2 mg/kg t.m./dan SFN izmeren je viši nivo gvožđa u odnosu na kontrolu. Dalje, promena u UIBC vrednosti kod mužjaka pacova bila je statistički značajna pri čemu je uočen značajan porast u SFN 2 grupi dok su vrednosti u druge 2 tretirane grupe bile slične kontrolnim. UIBC se, takođe, dovodi u vezi sa nivoom gvožđa u serumu, koji je u slučaju mužjaka pacova bio u okviru referentnih vrednosti. U *in vivo* studiji na miševima koja je prethodno pokušala da razjasni uticaj SFN na nivo gvožđa u krvi pokazano je da nakon 4 nedelje tretmana, SFN sprečava deponovanje gvožđa u jetri i, time njeno dalje oštećenje (204). Pored toga, opisan je protektivan efekat SFN na distribuciju gvožđa u kardiomiocitima pacova tretiranim 500 µg/kg/dan SFN tokom 3 dana, intraperitonealno ukazujući na vezu između pomenutog imunomodulatora i homeostaze gvožđa (205) koju treba dalje ispitati.

Dok kod ženki pacova nije uočena statistički značajna razlika u biohemijskim parametrima povezanim sa funkcijom jetre (ukupni proteini, albumin, AST, ALT, ALP) nakon subakutne peroralne primene SFN u 3 rastuće doze, kod mužjaka pacova uočen je statistički značajan porast nivoa ukupnih proteina u grupi SFN 3 u poređenju sa SFN 1, kao i porast albumina u SFN 2 i SFN 3 grupi u odnosu na SFN 1 i kontrolu. Ovo se može objasniti činjenicom da SFN poseduje visok afinitet za vezivanje za albumin u serumu čineći ga tako serumskim proteinom nosačem odgovorim za dopremanje SFN u ciljno tkivo (206). SFN se vezuje za lizinske ostatke proteina u krvi formirajući adukte koji nisu samo bio marker ekspozicije, već i potencijalni markeri za identifikaciju efekta SFN na ćelijskom nivou (207). Stoga, ne čudi da sa porastom primenjene doze SFN, raste i nivo ukupnih proteina i albumina u serumu tretiranih pacova. Blagi porast uočen je i kod ženki, ali bez statističke značajnosti. Dodatno, prethodne studije pokazale su i da SFN redukuje povišene nivoe ALT i AST koji su posledica oštećenja jetre (208-210). U *in vivo* istraživanju sprovedenom od strane Zhao i sar. (2010) korišćeni su mužjaci pacova kod kojih je oštećenje jetre izazvala intestinalna ishemija-reperfuzija. Oni su primetili da primena SFN u dozi od 3 mg/kg t.m./dan smanjuje povišene nivoe ALT i AST u serumu, ali i povećava aktivnost SOD, GSH i glutation-peroksidaze (208). Slično tome, primena 30 mg/kg t.m./dan SFN kod mužjaka miševa, smanjuje oksidativno oštećenje jetre i reguliše status/nivo enzima jetre (209). Mansouri i sar. (2024) pokazali su da lipopolisaharidi iz *Escherichia coli* (O111: B4) kod mužjaka miševa izazivaju povećanje nivoa parametara funkcije jetre (ALT i AST), kao i nivo MDA. Primena SFN u dozi od 25 mg/kg t.m./dan, tokom 2 nedelje, delovala je hepatoprotektivno i dovela do sniženja nivoa pomenutih biomarkera oštećenja jetre (210). Interesantno je da su u sve 3 pomenute studije korišćene različite doze SFN, što znači da uticaj na aktivnost enzima jetre ne zavisi od primenjene doze SFN što je potvrđeno i u ovoj doktorskoj disertaciji korišćenjem BMD analize. Jedan od faktora koji može uticati na efekat SFN jeste nivo ALT i AST u serumu, odnosno stepen oštećenja tkiva jetre. Dodatno, BMD analiza sprovedena u ovom istraživanju pokazala je da porast nivoa albumina i hlorida u serumu mužjaka pacova može zavisiti od primenjene doze SFN (BMDL 0,0237 i 7,07 mg/kg t.m./dan, redom).

5.1.3.2.3. Nivo hormona

U sprovedenoj doktorskoj disertaciji praćen je i uticaj SFN na hormone tiroidne žlezde i testosteron pri čemu su dobijeni različiti efekti između polova. Dok su nivoi T3 i T4 bili statistički značajno viši u SFN 2 grupi u odnosu na kontrolu kod mužjaka pacova, njihove vrednosti u SFN 1 i SFN 3 nisu se značajno razlikovale od kontrolne grupe. Pored toga, uočeno je smanjenje FT3 u SFN 1 grupi u odnosu na kontrolu, pa potom porast u SFN 2

grupi, i ponovo smanjenje u SFN 3 tretiranoj grupi što može ukazati na hormetički odgovor FT3 na primenu SFN. Takođe, samo u SFN 2 grupi dobijen je statistički značajan pad nivoa testosterona. S druge strane, kod ženki tretiranih pacova uočen je statistički značajan porast T4 i FT4 hormona u SFN 2 grupi u odnosu na kontrolu. Iako su Galanty i sar. (2024) u svom skorašnjem sistematskom preglednom radu zaključila da izotiocijanati, uključujući SFN ne remete funkcije štitaste žlezde na osnovu 123 pregledane publikacije (211) važno je naglasiti da se ovi rezultati zasnivaju na efektima standardizovanog ekstrakta SFN iz klica brokolija, dok je u ovoj doktorskoj disertaciji korišćen sintetski dobijen sulforafan (D,L-SFN). Pomenute promene u sekreciji tiroidnih hormona mogu se delimično objasniti opisanom vezom između Keap1/Nrf2 signalnog puta i bolesti štitaste žlezde. Naime, Nrf2 igra važnu ulogu u održavanju mitohondrijalne homeostaze i strukturnog integriteta, posebno u uslovima oksidativnog, elektrofилnog i inflamatornog stresa, kada je pravilno funkcionisanje citoprotektivnih mehanizama ključno za preživljavanje ćelija. Bolesti tiroidne žlezde, kao i mnoga druga patološka stanja, karakterišu se oksidativnim stresom, inflamacijom i mitohondrijalnom disfunkcijom (212). Dodatno, polimorfizam u Nrf2-ciljanim genima NQO1 i NQO2 povezuju se sa proširenjem primarnog tiroidnog tumora i pojavom metastaza (213). Dakle, interakcijom sa Nrf2, SFN može uticati na funkciju štitaste žlezde i produkciju tiroidnih hormona, ali je ovu vezu neophodno dalje ispitati. Kako BMD analizom nije pronađena veza između primenjene doze i promene nivoa tiroidnih hormona kod mužjaka i ženki pacova, postavlja se pitanje koji faktor diktira odgovor T3, T4, FT3 i FT4 hormona na primenu SFN.

5.1.3.2.4. Produkcija proteina

In silico studije ukazale su na potencijal SFN da aktivira imunski odgovor stimulišući ekspresiju gena odgovornih za sintezu imunoregulatornih citokina kao što su: IL-6, IL-10, IFN γ , TNF α , TGF β , ali i gena uključenih u proces antioksidativne zaštite, prvenstveno *HMOX1* i *NFE2L2*. Dobijeni rezultati dalje su provereni u *in vivo* delu sprovedenog istraživanja, korišćenjem ELISA testa kojim su izmerene promene nivoa proteina u serumu ili homogenatu tkiva pod dejstvom SFN. Kao i što je očekivano, i kod mužjaka i kod ženki pacova primećen je statistički značajan porast nivoa Nrf2 u SFN 3 grupama, odnosno u grupama koje su primale najvišu dozu SFN. Dozno zavisno dejstvo SFN na Nrf2 potvrđeno je i BMD analizom koja je pokazala da su ženke osetljivije na SFN. Naime, kod ženki pacova primena samo 0,197 mg/kg t.m./dan SFN na dan dovodi do 5% povećanja nivoa Nrf2, dok je za isti efekat kod mužjaka pacova potrebno primeniti SFN u dozi od 0,377 mg/kg t.m./dan. Kako *Nrf2* diktira ekspresiju *HMOX1* gena koji kodira HO-1 protein (214), očekivao se i zabeležen porast nivoa HO-1 u SFN 3 grupi. Međutim, kod mužjaka pacova jedino statistički značajno povećanje u odnosu na kontrolu uočeno je u SFN 1 grupi. Dobijeni rezultati mogu se objasniti činjenicom da SFN reaguje sa tiolnim grupama Nrf2 proteina formirajući tionoacil proizvode i sprečavajući dalju posttranslacionu modifikaciju proteina, odnosno dodavanje ubikvitinskih lanaca i raspadanje (inaktivaciju) Nrf2. Posledično, SFN aktivira Nrf2-Keap1-ARE signalni put (23). Nrf2-Keap1-ARE igra centralnu ulogu u regulaciji adaptivnog ćelijskog odgovora na reaktivne kiseonične vrste, odnosno pokreće mehanizme zaštite ćelija od slobodnih radikala (215). Pored toga, brojna istraživanja pokazala su da aktivacija Nrf2-Keap1-ARE signalnog puta može doprineti smanjenju simptoma u bolestima poput dijabetesne nefropatije (216), hroničnih inflamatornih bolesti (217), multiple skleroze (218), ili Parkinsonove bolesti (219). Odnosno, pravilno funkcionisanje ovog signalnog puta pokazalo se neophodnim za održanje homeostaze u ćelijama. Dalje, poznato je i da Nrf2 ostvaruje važnu anti-inflamatornu ulogu dejstvom na enzime druge faze inflamacije, kao i inhibirajući NF-kB signalne puteve (22). Kobayashi i sar. (2016) pokazali su Nrf2 inhibira ekspresiju IL-6 citokina sprečavajući tako prekomernu aktivnost imunskog sistema (220). Ovo je u skladu

sa rezultatima dobijenim u okviru ove doktorske disertacije koji pokazuju statistički značajno smanjenje nivoa IL-6 kod mužjaka pacova u SFN 2 i SFN 3 grupi u odnosu na kontrolu. Međutim, kod ženki je uočen porast IL-6 u SFN 1 i SFN 2 u poređenju sa kontrolom. Pored toga, kod mužjaka uočen je porast IL-10 u svim tretiranim grupama, ali je najviši nivo zabeležen u SFN 2 u odnosu na kontrolu. U istoj grupi zabeležena je i smanjenja koncentracija IL-2 citokina što može ukazati na aktivaciju T regulatornih ćelija (221). Funkcija imunskog odgovora posredovanog T regulatornim ćelijama je sprečavanje prekomerne aktivacije imunskog sistema (222). S druge strane kod ženki pacova uočen je i statistički značajan porast TNF α u SFN 3 grupi u odnosu na kontrolu pri čemu je efekat bio doznno zavistan (izračunati BMD iznosi 0,372 mg/kg/dan). Međutim, dosadašnja ispitivanja pokazala su da SFN inhibira ekspresiju TNF α i smanjuje njegovu sekreciju (223) što zajedno sa inhibicijom IL-6 citokina može biti u osnovi SFN-posredovanog antidepresivnog, anksiolitičkog (224), kao i kardioprotektivnog dejstva (225). Razlika u dobijenim rezultatima može se objasniti time što je u ovom istraživanju nivo TNF α meren u homogenatu tkiva jetre, dok je u pomenutim studijama određivan njegov nivo u serumu. Odnosno, u skladu sa rezultatima dobijenim na modelu zebrice, postoji naznaka da SFN ostvaruje štetan efekat na nivou jetre, stimulišući produkciju TNF α . Zbog toga je dalje ispitan uticaj SFN na parametre oksidativnog stresa u jetri, ali i drugim organima tretiranih pacova.

5.1.3.2.5. Oksidativna oštećenja tkiva i patohistološka analiza

Antioksidativni potencijal SFN opisan je u brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama u kojima je objašnjeno da dejstvom na Nrf2/HO-1, SFN pokreće niz reakcija koje rezultiraju pojačanom aktivnošću SOD (152). U sprovedenom eksperimentu na mužjacima i ženkama pacova nije uočeno značajano povećanje nivoa parametara oksidacije, kao ni smanjenje parametara antioksidativne zaštite uz par izuzetaka. Tako je, na primer, u homogenatu tkiva jetre kod ženki pacova zabeleženo statistički značajno smanjenje aktivnosti SOD i koncentracije ukupnih SH grupa u SFN 3 grupi, u odnosu na SFN 1, ali bez promena u nivou IMA i MDA. Odnosno, SFN primenjen u najvišoj testiranoj dozi doprineo je smanjenju potencijala antioksidativne zaštite u jetri, ali ne i povećanju generisanja slobodnih radikala. Kod mužjaka pacova doznno zavisno smanjenje aktivnosti SOD dobijeno je i u SFN 1 i u SFN 3 grupi u odnosu na kontrolu. Pored toga, histopatološka analiza pokazala je statistički značajno veće ukupno mikroskopsko oštećenje tkiva jetre u SFN 3 grupi mužjaka pacova, dok je histološka struktura slezine ostala nepromenjena nakon SFN tretmana i kod mužjaka i kod ženki pacova. S druge strane, toksikogenomske analize ukazuju na povećanu ekspresiju SOD1 gena i proteina pod dejstvom SFN. Jung-Ran i sar. (2015) ispitali su hepatoprotektivno dejstvo SFN na modelu miševa kod kojih je hepatotoksičnost izazvana primenom acetaminofena. Rezultati ovog rada ukazali su na povećanje ekspresije SOD1 (226), ali je važno pomenuti da je ekspresija ovog gena nije merena u tkivu jetre zdravog miša tretiranog samo SFN. Takođe, u radu Chen i sar. (2021) pacovi sa hepatičkom ishemijskom reperfuzijom tretirani su dozom SFN od 5 mg/kg, oralno što je rezultiralo povećanjem aktivnosti SOD. Međutim, kao što je prethodno pomenuto, ni u ovom radu nije merena aktivnost SOD u kontrolnoj grupi pacova bez reperfuzione povrede jetre (227). Slično tome u plućima mužjaka pacova uočen je porast nivoa IMA i MDA koji je bio najizraženiji u SFN 2, odnosno SFN 3 grupi, redom. Međutim, paralelno sa nivoom IMA i MDA, rasla je i aktivnost SOD u plućima tretiranih pacova koja je bila statistički značajno viša u SFN 3 grupi u odnosu na kontrolu što je u skladu sa rezultatima dobijenim na embrionima zebrice. Ovo može značiti da su pluća pacova osetljivija na dejstvo SFN, ali zahvaljujući dejstvu na Nrf2, SFN održava oksido-reduktivni balans u plućima. U *in vivo* ispitivanju na mužjacima miševa, Pan i sar. (2023) pokazali su da primena 2 mg/kg t.m./dan SFN, tokom 4 nedelje, doprinosi povećanju

aktivnosti SOD u serumu kao i nivou GSH, dok smanjuje koncentraciju MDA i produkciju ROS sprečavajući tako proliferaciju ćelija glatkih mišića plućnih arterija i remodelovanje plućne vaskulature (228). U epitelijalnim ćelijama pluća, SFN je sprečio pojavu oksidativnog stresa uzrokovanog PM_{2,5} česticama dejstvom na Nrf2 i posledično, stimulacijom ekspresije antioksidativnih gena, NQO1 i HO-1 (229). Kod ženki pacova, viđen je značajan porast MDA u plazmi u sve tri tretirane grupe, ali je najviši nivo izmeren u SFN 1 grupi u odnosu na kontrolu. Pored toga, u tkivu bubrega ženki pacova zabeležen je porast koncentracije IMA i MDA u SFN 3 grupi, ali paralelno i porast vrednosti parametara antioksidativne zaštite, GSH, SH grupa i SOD. Pozitivan trend krive za GSH, IMA, SH i SOD dobijen je BMD analizom, pri čemu je najosetljiviji parametar bila aktivnost SOD, kod koje je BMDL $4,82e^{-5}$ mg/kg t.m./dan SFN. U meta analizi publikovanoj od strane Monteiro i sar. (2023) utvrđeno je da SFN ostvaruje renoprotektivno dejstvo i sprečava nastanak bubreže insuficijencije (230). Jedan od predloženih mehanizama jeste i aktivacija enzima antioksidativne zaštite, uključujući i GSH (231).

In vitro rezultati ovog rada pokazali su da je efekat SFN na produkciju ROS u ćelijama malignog tumora doznno zavistan, pri čemu niže koncentracije dovode do smanjenja generisanja slobodnih radikala, a više do pojave oksidativnog stresa i apoptoze. U skladu sa time, *in vivo* rezultati ukazuju na sposobnost SFN da održi oksido-reduktivni status u ispitivanim organima kod mužjaka i ženki pacova, pri čemu je jetra najosetljivija na njegovo dejstvo.

5.2. Toksičnost inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

5.2.1. *In silico* analiza

Sprovedena *in silico* analiza pokazala je da PA-MSHA reaguje sa genima uključenim u proces apoptoze i regulaciju imunskog odgovora. Neki od ključnih gena koji su se izdvojili su *IFNG*, *IL-2*, *IL-6*, *IL-10*, *TNF* i *TLR4* ali i *AKT1*, *BCL2*, *CASP3*, *JUN* i *TP53*. Dejstvom na pomenute gene i njihove produkte - citokine, PA-MSHA reguliše molekularne puteve kao što su signalni put tiroidnih hormona, signalni putevi interleukina, ali i inflamacijom-indukovana apotoza. Ovo je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima Liu i Duan (2017) koji su pokazali da PA-MSHA u koncentraciji od 10^6 ćelija/ml stimuliše apoptozu ćelija tumora bešike, a inhibira njihovu proliferaciju i smanjuje invazivnost i migraciju kako *in vitro*, tako i *in vivo*. Predloženi mehanizam dejstva zasniva se na stimulaciji M1 polarizacije makrofaga i posledično, pojačane sekrecije inflamatornih citokina, IL-12, TNF α i IFN γ . Ovi citokini dalje pospešuju fagocitnu sposobnost M1 makrofaga i tako zaustavljaju rast i razvoj tumora (102). Fagocitoza je proces kojim fagociti, uključujući makrofage, neutrofile i monocite, eliminišu patogene, uklanjaju strane čestice i izumrlu ćeliju (232). S druge strane, dejstvom na *AKT1*, *BCL2* i/ili *CASP3*, PA-MSHA direktno reguliše proces ćelijske apoptoze. Dok su *AKT1* i *BCL2* geni koji kodiraju anti-apoptotske proteine i time zaustavljaju proces apoptoze (233, 234), *CASP3* kodira kaspazu 3, enzim ključan za izvršenje programirane ćelijske smrti (235). Stoga, neophodno je dalje istražiti vezu između PA-MSHA i pomenutih gena u cilju boljeg razumevanja relacije PA-MSHA - apoptoza.

5.2.2. *In vitro* analiza

Chang i sar. (2014) ispitali su citotoksični potencijal PA-MSHA *in vitro*, koristeći tri ćelijske kulture malignog tumora bešike (T24, 5637, i HT-1376) (104). Primećeno je da PA-MSHA dovodi do smrti 22,3% ćelija karcinoma nakon 48 h kada se primeni u

koncentraciji od $0,9 \times 10^9$ ćelija/ml. Pretpostavljeni mehanizam dejstva uključuje aktivaciju kaspaza 3, 8 i 9 (104). Sličan efekat dobijen je u radu Zhao i sar. (2016) koji su tretirali ćelije karcinoma pluća i to: PC-9, A549 i NCI-H1975. U korišćenim ćelijskim linijama primena PA-MSHA u koncentraciji od $1,25 \times 10^9$ ćelija/ml izazvala je smrt 25,78% tretiranih ćelija, 26,08% i 21,11%, redom, posredstvom aktiviranih kaspaza (71). Međutim, indukcija kaspaza nije jedini mehanizam kojim PA-MSHA ostvaruje antitumorske efekte. Cheng i sar. (2016) ispitali su uticaj inaktivisane bakterije na ćelije poreklom iz karcinoma pankreasa, PANC-1 i SW1990 i utvrdili da je koncentracija od 1×10^9 ćelija/ml dovela do smrti oko 20% tretiranih ćelija nakon 48 h, kao i da je inhibicija EGFR signalnog puta ključna za uočene efekte (100). U sprovedenim istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije uočen je sličan citotoksični potencijal pri primeni najniže i najviše koncentracije PA-MSHA na ispitivanim ćelijskim linijama zbog čega se ne može izvesti zaključak da u *in vitro* uslovima pokazuje citotoksičnost. Primena $0,18 \times 10^9$ ćelija/ml PA-MSHA tokom 72 h dovela je do apoptoze 19% tretiranih HT-29 ćelija što se nije statistički značajno razlikovalo od efekata uočenih pri primeni $0,0225 \times 10^9$ ćelija/ml, $0,045 \times 10^9$ ćelija/ml i $0,09 \times 10^9$ ćelija/ml PA-MSHA (Slika 10). Budući da PA-MSHA spada u grupu imunomodulatora, za ispoljavanje citotoksičnog efekta potreban je drugačiji eksperimentalni sistem koji uključuje ćelije imunskog sistema.

5.2.3. *In vivo* analiza

5.2.3.1. Akutna toksičnost na modelu zebice

Rezultati ispitivanja akutne toksičnosti na embrionima zebice pokazali su da PA-MSHA u koncentraciji većoj od 0,3% ($5,4 \times 10^6$ ćelija/ml) indukcije pojavu kardiotoksičnosti, uključujući perikardijalni edem i usporavanje rada srca, kao i pojavu hepatotoksičnosti, odnosno nekrozu jetre i odsustvo resorpcije žumanceta kod svih tretiranih embriona. Modelovanjem odnosa koncentracija-odgovor, izračunata je donja granica pouzdanosti koja može izazvati toksičnost na nivou kardiovaskularnog sistema, nekrozu jetre i teratogene malformacije embriona zebice, i ona iznosi 0,342%, odnosno $6,15 \times 10^6$ ćelija/ml. Uticaj na razvoj mehura primećen je kod svih tretiranih embriona zebice kada je koncentracija PA-MSHA bila veća ili jednaka od 1% ($1,8 \times 10^7$ ćelija/ml) što može ukazivati na to da je respiratorni sistem manje osetljiv na dejstvo PA-MSHA od jetre i kardiovaskularnog sistema. Dodatno, modelovanjem odnosa koncentracija-odgovor izračunato je da primena PA-MSHA u koncentraciji većoj od $7,78 \times 10^6$ ćelija/ml može uticati na razvoj mehura. Malformacije kod tretiranih embriona primećene su pri koncentracijama PA-MSHA većim od 0,3% ($5,4 \times 10^6$ ćelija/ml). Letalni ishod je zabeležen kod skoro 70% embriona zebice pri koncentraciji od $5,4 \times 10^7$ ćelija/ml, dok je tretman sa 5% PA-MSHA (9×10^8 ćelija/ml) doveo do smrti svih ispitivanih embriona. Izračunata LC50 vrednost iznosila je $5,04 \times 10^7$ ćelija/ml, što je potvrđeno i modelovanjem odnosa koncentracija-odgovor (BMC analizom) u kojoj je dobijen interval od $4,7 \times 10^7$ ćelija/ml do $5,66 \times 10^7$ ćelija/ml.

5.2.3.2. Subakutna toksičnost na modelu pacova

5.2.3.2.1. Unos vode, hrane, relativna masa organa i prirast telesne mase

Kao i u slučaju SFN, unos hrane i vode, a posledično i relativna masa organa i prirast telesne mase varirali su tokom trajanja eksperimenta i kod mužjaka i kod ženki pacova tretiranih rastućim dozama PA-MSHA. Uočena je značajna razlika u ponašanju mužjaka i ženki pacova u pogledu unosa vode i hrane. Dok su tretirani mužjaci unosili statistički

značajno više vode i hrane u svim vremenskim periodima, sa izuzetkom 28. dana tretmana, unos vode kod ženki pacova varirao je tokom trajanja eksperimenta. Međutim, interesantno je pomenuti da se prirast telesne mase mužjaka pacova razlikovao od kontrole samo na kraju eksperimenta, kada je dobijeno smanjenje od 13% i 19% u PA-MHSA 2 i PA-MSHA 3 grupama, redom. Dodatno, primećen je statistički značajan porast relativne mase pluća i srca, a smanjenje jetre. Suprotno tome, kod ženki pacova zabeležen je statistički značajno smanjenje telesne mase u svim tretiranim grupama i svim vremenskim periodima u odnosu na kontrolu, ali je najizraženiji bio u prve dve nedelje tretmana. Jedino je zabeleženo smanjenje relativne mase jetre u PA-MSHA 3 grupi i porast relativne mase srca u PA-MSHA 2.

Dobijeni rezultati mogu se objasniti metaboličkim i hormonalnim razlikama između polova. Dobro je poznato da tiroidni hormoni igraju važnu ulogu u metaboličkim procesima u organizmu, uključujući metabolizam lipida, proteina i šećera (236) pri čemu hipotireoidizam može dovesti do pojave gojaznosti, a hipertireoidizam do smanjenja telesne mase (237). Dodatno, i drugi hormoni mogu uticati na telesnu masu, kao što je testosteron, čiji porast nivoa u serumu dovodi do gubitka telesne mase (238, 239). *In silico* rezultati u ovoj doktorskoj disertaciji pokazali su da postoji veza između PA-MSHA i signalnog puta tiroidnih hormona, koja može biti polno-specifična, što je neophodno dalje ispitati. Stoga, u cilju razjašnjenja iznetih rezultata, ispitan je i uticaj PA-MSHA na biohemijske parametre, uključujući lipidni status, kao i na nivo tiroidnih hormona i testosterona u serumu tretiranih mužjaka i ženki pacova.

5.2.3.2.2. Hematološki i biohemijski parametri

U grupama tretiranim PA-MSHA uočene su značajnije promene u hematološkim parametrima u odnosu na SFN. U odnosu na kontrolu, zabeležen je porast broja leukocita u grupi PA-MSHA 1, a potom smanjenje u grupama PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3. Pored toga, procenat monocita, broj eritrocita i nivo hematokrita bio je značajno niži u tretiranim grupama u poređenju sa kontrolom. U slučaju eritrocita i hematokrita, efekat je zavisio od primenjene doze PA-MSHA što je potvrđeno uz pomoć BMD analize. Izračunate BMDL vrednosti pokazuju da je parametar hematokrit osetljiviji na dejstvo PA-MSHA u odnosu na broj eritrocita, odnosno da primena niže doze može izazvati pomenute promene. Promene su uočene i u biohemijskim parametrima anemije, nivou gvožđa i koncentraciji TIBC. U grupama PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 dobijeno je smanjenje gvožđa u odnosu na kontrolu, kao i u PA-MSHA 3 grupi u odnosu na PA-MSHA 1, što ukazuje na dozno-zavisni efekat. *Benchmark* analizom potvrđeno je da porastom doze raste mogućnost pojave neželjenog efekta, odnosno smanjenja nivoa gvožđa u serumu mužjaka pacova. Izračunata BMDL vrednost iznosila je $0,00159 \times 10^9$ ćelije/ml što je manje od najniže primenjene doze u ovoj doktorskoj disertaciji. Posledično, koncentracija TIBC bila je niža u PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 u odnosu na PA-MSHA 1. S druge strane, MCHC bio je značajno viši u tretiranim grupama u odnosu na kontrolu, pri čemu je modelovanjem odnosa doza-odgovor potvrđeno da uočene promene zavise od primenjene doze. Iako se visok nivo MCHC uglavnom povezuje sa anemijom, on može biti posledica i drugih stanja, kao što su oštećenje jetre (240) i pojačana aktivnost tiroidne žlezde (234). Pored toga, Dorgalaleh i sar. (2013) su pokazali da osobe sa hipertireoidizmom imaju niži nivo eritrocita, hemoglobina i MCV parametra uz porast MCHC vrednosti (242). Slično tome, Amed i Mohammed (2020) objasnili su da se kod žena češće javljaju poremećaji hematoloških parametara koji su posledica hiperaktivnosti tireoidee. Visok nivo tiroidnih hormona negativno korelira sa brojem eritrocita u krvi, koncentracijom hemoglobina i MCV, a pozitivno sa MCHC parametrom (243). Ovo je u skladu sa rezultatima dobijenim u sprovedenoj doktorskoj disertaciji, obzirom da su ženke pacova pokazale veću osetljivost

na PA-MSHA kada su u pitanju hematološki i biohemijski parametri. Naime, statistički značajan porast broja i procenta neutrofila, kao i MCHC koncentracije uočen je u sve tri tretirane grupe pacova. Sa porastom primenjene doze PA-MSHA rasla je i mogućnost promene navedenih parametara što je potvrđeno BMD analizom. Međutim, u prethodno sprovedenim kliničkim studijama, primena PA-MSHA svakog drugog dana u dozi od $1,8 \times 10^9$ ćelije/ml, dovela je do neutropenije i leukopenije (85, 111). Uočene razlike mogu se objasniti činjenicom da su pomenute kliničke studije ispitivale efikasnost PA-MSHA kao dopunske terapije kod pacijenata obolelih od karcinoma, čiji je imunski sistem već kompromitovan. Dalje, koncentracija hematokrita i broj eritrocita smanjivale su sa porastom primenjene doze PA-MSHA (u odnosu na kontrolu) što je potvrđeno i modelovanjem-odnosa doza-odgovor. Iako je nivo gvožđa bio neizmenjen nakon tretmana u serumu ženki pacova, razlika je uočena u TIBC parametru. U odnosu na kontrolu i PA-MSHA 1 grupu, TIBC vrednosti bile su niže u PA-MSHA 2 grupi, dok je u PA-MSHA 3 grupi TIBC bio niži u odnosu na PA-MSHA 2. Takođe, UIBC se razlikovao između tretiranih grupa pa je u PA-MSHA 2 grupi koncentracija UIBC parametra bila značajno niža u odnosu na PA-MSHA 1. Međutim, nije pronađena veza između primenjene doze PA-MSHA i TIBC, odnosno UIBC parametra. Dodatno, porast broja leukocita i limfocita primećen je u PA-MSHA 2 u odnosu na kontrolu kod ženki pacova, dok su kod mužjaka najosetljiviji na PA-MSHA bili eozinofili. Pri primeni samo $1e^{-6} \times 10^9$ ćelije/ml PA-MSHA (BMDL) uočava se porast u procentu eozinofila u krvi mužjaka pacova. Porast nivoa eozinofila može ukazivati na aktivaciju Th2 ćelija koje sekretuju pored IL-4, IL-13 i IL-5 važne faktore za aktivaciju i umnožavanje eozinofila, ali i alergijsku reakciju (244), odnosno osetljivost tretiranih životinja na PA-MSHA. Kod ženki pacova porast eozinofila uočen je samo u PA-MSHA 1 grupi.

PA-MSHA tretman doveo je i do promena u koncentraciji LDL i triglicerida u serumu mužjaka i ženki pacova. Sprovedenom BMD analizom uočeno je da primenjena doza PA-MSHA diktira porast nivoa LDL holesterola samo kod ženki pacova, a koncentraciju triglicerida u oba pola. Izračunate BMDL vrednosti za trigliceride iznosile su $0,0192 \times 10^9$ ćelija/ml, odnosno $1e^{-6} \times 10^9$ ćelija/ml PA-MSHA, kod mužjaka i ženki pacova, redom. Važno je napomenuti i da je odnos BMDL/BMDU bio manji od 10 kod mužjaka pacova, što ukazuje na veću pouzdanost dobijenih rezultata.

Pored toga, kod mužjaka i ženki pacova uočeno je i smanjenje koncentracije parametara funkcije bubrega, kreatinina i mokraćne kiseline, kao i nivoa kalcijuma u tretiranim grupama. Kod ženki pacova, ovo smanjenje zavisilo je od primenjene doze PA-MSHA (BMD analiza). Takođe, dobijen je i porast nivoa hlorida, koji je bio statistički značajan samo kod mužjaka pacova. Na osnovu predstavljenih rezultata može se pretpostaviti da PA-MSHA remeti funkcije bubrega. Parametri funkcije jetre i to: nivo albumina i koncentracija alkalne fosfataze bili su niži u tretiranim grupama, dok su vrednosti AST i ALT bile slične kontrolnim. Dok je nivo alkaline fosfataze zavisio od primenjene doze PA-MSHA kod oba pola, albumin pokazuje doznu-zavisnost samo kod mužjaka pacova. Stoga, u budućim istraživanjima treba dalje ispitati uticaj inaktivisane bakterije na bubrege i jetru pacova, s ciljem razjašnjavanja mehanizama nastanka potencijalnih štetnih efekata.

5.2.3.2.3. Nivoi hormona

Nakon 28. dana eksperimenta nivoi T3, T4, kao i fT3 i fT4 su kvantifikovani, nakon čega je izračunat odnos T3/T4. Rezultati su ukazali na polno specifične hormonske odgovore na različite doze PA-MSHA. Kod ženki, primenjene doze PA-MSHA u grupama PA-MSHA 1 i PA-MSHA 3 značajno su povećale nivoe T3, pri čemu je najviša primenjena doza izazvala izraženiji efekat. Pored toga, obe doze su izazvale uporediva povećanja fT3, što

ukazuje na potencijalni efekat praga ili tačku zasićenja u hormonskom odgovoru. U prilog tome govori i rezultat BMD analize u kojoj nije pronađena veza između doze PA-MSHA i T3, odnosno fT3 nivoa. Kod mužjaka, u PA-MSHA 2 grupi zabeležen je značajan pad nivoa fT3, pri čemu je modelovanjem odnosa doza-odgovor izračunata i BDML vrednost, $2,24e^{-6} \times 10^9$ ćelija/ml PA-MSHA. U grupi PA-MSHA 3 uočeno povećanje nivoa fT4. Međutim, i kod mužjaka i kod ženki, odsustvo statistički značajne razlike u odnosu T3/T4 sugerise da je relativna ravnoteža između tiroidnih hormona ostala konstantna u eksperimentalnim grupama i kontrolnoj grupi, odnosno da ukupna hormonska ravnoteža štitaste žlezde nije narušena. Drugim rečima, prethodno pomenuti štetni efekti PA-MSHA na nivou metabolizma i parametara anemije verovatno nisu posledica poremećaja rada štitaste žlezde. Ipak, dobijeni rezultati ističu značaj polno specifičnih razmatranja pri razvoju i primeni terapijskih intervencija koje uključuju PA-MSHA. Dodatno, promene na nivou testosterona nisu dobijene ni kod mužjaka ni kod ženki pacova tretiranih rastućim dozama PA-MSHA.

5.2.3.2.4. Produkcija proteina

Primena inaktivisane bakterije PA-MSHA ima za cilj da aktivira prvenstveno urođeni imunski odgovor, a zatim i stečeni i pojača odbrambenu sposobnost organizma (107). Stoga, ne čude rezultati dosadašnjih studija u kojima je uočeno da primena $1,8 \times 10^9$ ćelija/ml PA-MSHA svakog drugog dana dovodi do porasta nivoa limfocita (78), dok $0,9 \times 10^9$ ćelija/ml PA-MSHA stimuliše oslobađanje proinflammatoryh citokina i to, TNF α , IL-1b, IL-6, a potom antiinflammatoryh proteina, IL-4 i IL-10, sprečavajući tako prekomernu aktivnost imunskog sistema (83, 113). Sekretovani citokini, IL-4 i IL-10, inhibiraju TLR-4/NF- κ B signalni put čime smanjuju prisutnu inflamaciju, što je potvrđeno i u studiji Zahng i sar. (2019) (245). Slično tome, *in silico* i *in vivo* rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju na sposobnost PA-MSHA da stimuliše sekreciju proinflammatoryh citokina, IL-2 i IFN γ , što je praćeno i višim koncentracijama antiinflammatoryh citokina, IL-10 i TGF β , kod mužjaka i ženki pacova, a što može biti u osnovi detektovane eozinofilije. Koncentracija IFN γ , IL-10 i TGF β zavisila je od primenjene doze PA-MSHA što je potvrđeno BMD analizom. Kod mužjaka pacova, najosetljiviji parametar inflamacije, odnosno citokin koji reaguje na najnižu primenjenu dozu PA-MSHA bio je TGF β , za koga je izračunata BMDL vrednost $3,37e^{-5} \times 10^9$ ćelija/ml. Kod ženki pacova, prvo je moguće uočiti promenu u nivou IFN γ , pri primeni $1e^{-6} \times 10^9$ ćelija/ml PA-MSHA. Dodatno, kod tretiranih ženki pacova uočeno je povećanje aktivnosti Nrf2 zavisno od primenjene doze pri čemu je dobijeni BMDL/BMDU interval uzak, ukazujući na visoku pouzdanost rezultata. Suprotno tome, jedina prethodno uočena veza između PA-MSHA i Nrf2 objašnjena je u radu Wei i sar. (2016) koji su tretirali doksorubicin-rezistentne ćelije karcinoma dojke inaktivisanom bakterijom u koncentraciji od $0,848 \times 10^9$ ćelija/ml tokom 24 h. PA-MSHA tretman zaustavio je rast i izazvao smrt ćelija raka, inhibicijom Nrf2/p62 signalnog puta. Ovaj efekat potvrđen je i na ksenograft modelu ženki miševa injektovanih doksorubicin-rezistentnim ćelijama raka, a tretiranim PA-MSHA u dozi od $0,533 \times 10^9$ ćelija/ml svakog drugog dana (90). Budući da je najviša primenjena doza PA-MSHA u sprovedenoj disertaciji niža od doze korišćene u radu Wei i sar. (2016), može se pretpostaviti da primenjen tretman izaziva hormetički odgovor Nrf2. Prekomerna aktivacija ili inhibicija imunskog odgovora može dovesti do pojave štetnih efekata. Međutim, iako dobijeni rezultati potvrđuju interakciju PA-MSHA i imunskog sistema, paralelan rast nivoa pro- i anti-inflammatoryh citokina ukazuje na održanje inflamatornog balansa pod uticajem ispitivanog imunomodulatora.

5.2.3.2.5. Oksidativna oštećenja tkiva i patohistološka analiza

Primena PA-MSHA tokom 28 dana dovela je do porasta parametara oksidativnog stresa, i to MDA u plazmi tretiranih mužjaka i ženki pacova, kao i smanjenja IMA i ukupnih SH grupa. Dok u tkivu bubrega nisu uočene značajne promene oksidativnih parametara, u jetri mužjaka i ženki pacova došlo je do značajnog povećanja MDA parametra u PA-MSHA 3 grupi koje je zavisilo od primenjene doze. *Benchmark* analiza pokazala je da su mužjaci osetljiviji na PA-MSHA, odnosno da niža koncentracija može dovesti do porasta nivoa MDA u tkivu jetre (Slika 49 i 55). Pored toga, histopatološka analiza tkiva jetre pacova ukazuje na značajno smanjenje deponovanja glikogena u PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 grupama u poređenju sa kontrolom kod mužjaka pacova, odnosno u PA-MSHA 3 grupi kod ženki tretiranih pacova. Međutim, interesantno je da je primenjen tretman, povećao ukupno mikroskopsko oštećenje samo u PA-MSHA 3 grupi ženki pacova. Dobijeni rezultati ukazuju na potencijal PA-MSHA da izazove oksidativno oštećenje jetre u eksperimentalnim životinjama oba pola što može biti posledica PA-MSHA-zavisne povećane produkcije proinflammatoryh citokina i stimulacije imunskih ćelija, pre svega neutrofila. Međutim, skorašnja istraživanja pokazuju da neutrofili, zapravo, igraju važnu ulogu u reparaciji jetre i to, zahvaljujući pojačanoj produkciji slobodnih radikala koji stimulišu diferencijaciju makrofaga iz proinflammatoryh M1 u antiinflammatory M2 makrofage koje podstiču reparaciju tkiva (246). M2 makrofage karakteriše produkcija antiinflammatoryh citokina kao što su IL-10 i TGF β (247) što objašnjava uočen porast ovih citokina u sprovedenom istraživanju. Dodatno, organ mužjaka pacova osetljiv na primenu PA-MSHA bila su pluća, kod kojih je uočen porast parametra oksidacije IMA u zavisnosti od primenjene doze, a pad GSH, odnosno smanjenje aktivnosti antioksidativne zaštite što je u skladu sa rezultatima dobijenim na zebrecima. Međutim, paralelno se uočava i porast aktivnosti SOD koja štiti pluća od oksidativnog stresa. Slično tome, u srcu i timusu tretiranih mužjaka pacova uočen je porast svih merenih parametara oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite. Iako je nivo IMA i MDA porastao u odnosu na kontrolu, odbrambeni mehanizmi, odnosno aktivnost SOD i GSH takođe su bili viši u poređenju sa kontrolom pa je struktura tkiva timusa ostala nepromenjena što je potvrđeno histološkom analizom. Pluća, srce i tumus ženki pacova, pokazali su manju osetljivost na PA-MSHA. U tkivu srca, zabeležen je samo porast GSH i SOD, odnosno parametara antioksidativne zaštite, dok u plućima nije bilo razlike u odnosu na kontrolu. Konačno, u timusu tretiranih ženki pacova uočava se porast svih merenih parametara, ali je samo nivo GSH i MDA zavisio od primenjene doze PA-MSHA što je pokazano BMD analizom. Izračunate BMDL vrednosti iznosile su, $1,09e^{-6} \times 10^9$ ćelija/ml, odnosno $1e^{-6} \times 10^9$ ćelija/ml, redom. Hematološka analiza kod ženki pacova pokazala je da inaktivisana bakterija povećava broj limfocita čija se proizvodnja, sazrevanje, ali i eliminacija vrši u timusu (248). Međutim, osnovna patohistološka analiza pokazala je da oksido-reduktivnog balansa u tkivu timusa ženki pacova nije narušen. Patohistološka analiza uzorka tkiva slezine, nije pokazala promene u PA-MSHA-tretiranim grupama u odnosu na kontrolu.

5.3. Toksičnost kombinovane primene sulforafana i inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

5.3.1. *In silico* analiza

In silico analiza zasniva se na interakcijama koje SFN, odnosno PA-MSHA ostvaruju sa genima. Komparativna tokiskogenomička baza podataka identifikovala je 1933 SFN-intereagujućih gena, dok je za PA-MSHA, literaturnom pretragom otkriveno samo 64 gena. Imajući u vidu da i SFN i PA-MSHA spadaju u grupu imunomodulatora, očekivano

je da utiču na slične gene regulišući tako funkcije imunskog sistema i procese povezane sa imunskim odgovorom, kao što je apoptoza. U sprovedenom istraživanju identifikovano je 13 zajedničkih gena, među kojima su pro-inflamatorni citokini, *TNF* i *INFG*, čija je ekspresija pojačana dejstvom PA-MSHA, ali ne i SFN. Naime, dobijeni rezultati ukazuju na oprečno dejstvo SFN na nivou *IFNG*, a dvojno (stimulišuće i inhibitorno) na nivou *TNF* što može zavisiti od primenjene doze i dužine trajanja ekspozicije. Oba imunomodulatora intereaguju sa CD14 proteinom u istom smeru, povećavajući njegovu ekspresiju. CD14 je visoko eksprimiran na M1 makrofagama uključenim u proces fagocitoze (232), što ukazuje da su imunski odgovori posredovani njihovim dejstvom. Takođe, stimulišući ekspresiju *CASP3*, *CASP8* i *BAX*, SFN i PA-MSHA direktno utiču na proces apoptoze što može biti u osnovi njihovog antitumorskog efekta. Dobijene rezultate neophodno je dalje ispitati u cilju razumevanja veze između kombinovane primene SFN i PA-MSHA i imunskog sistema, pre svega pomenutih pro-inflamatornih citokina.

5.3.2. *In vitro* analiza

Kombinovani citotoksični efekat SFN i PA-MSHA ispitan je na dve ćelijske linije humanog karcinoma kolona, HCT-116 i HT-29 tako što su ćelije tretirane istovremeno tokom 72 h ili prvo SFN tokom 24 h, a potom PA-MSHA još 72 h. U oba slučaja, uočeno je da SFN diktira citotoksičnost, u smislu da su efekti kombinovanog tretmana slični efektima primene samo SFN, pri čemu su HCT-116 ćelije pokazale veću osetljivost na primenjenu kombinaciju imunomodulatora. Međutim, kombinovana primena dovela je do smrti manjeg broja ćelija u odnosu na pojedinačnu primenu inhibitorne koncentracije SFN (za HCT 8,41 μ M SFN, za HT-29, 24,83 μ M SFN), ukazujući na smanjeno citotoksično dejstvo kombinacije SFN i PA-MSHA u odnosu na citotoksično dejstvo samog SFN. Mehanistički, kao i pojedinačna primena SFN, kombinovana primena imunomodulatora, mogla bi da dovede do smrti ćelija karcinoma kolona aktivacijom p53 signalnog puta, što je u skladu sa prethodno objavljenim radom Wang i sar. (2021) (187). Dodatno, pretretman malignih ćelija SFN, a potom tretman PA-MSHA, doveo je do smrti većeg broja ćelija u odnosu na istovremenu primenu SFN i PA-MSHA.

5.3.3. *In vivo* analiza

5.3.3.1. Akutna toksičnost na modelu zebriće

Toksičnost kombinovane primene SFN i PA-MSHA ispitana je kod embriona starosti 6 hpf do 120 hpf, korišćenjem koncentracija pojedinačnih imunomodulatora koje nisu imale uticaj na preživljavanje embriona, niti su indukovale pojavu znaka kardiotoksičnosti (perikardijalni edem), odnosno hepatotoksičnosti (redukovana resorpcija žumanceta i nekroza jetre). Letalni efekat je konstatovan pri koncentracijama SFN ≥ 4 μ g/ml i PA-MSHA $\geq 0,25\%$, ali je preživljavanje u svim ispitivanim kombinacijama bilo veće od 50%. Dok su najveće koncentracije bez štetnog efekta pojedinačno primenjenih SFN i PA-MSHA, iznosile 3 μ g/ml i 0,3%, u kombinovanom tretmanu je najveća koncentracija bez štetnog efekta SFN bila 1 μ g/ml, odnosno 0,1% PA-MSHA ($1,8 \times 10^6$ ćelija/ml). Prema ispitivanjima na embrionima zebrića SFN i PA-MSHA se mogu bezbedno kombinovati u koncentraciji od 5 μ g/ml SFN i do 0,1% PA-MSHA, odnosno 0,3% PA-MSHA ($5,4 \times 10^6$ ćelija/ml) i do 1 μ g/mL SFN. Pri kombinaciji većih koncentracija imunomodulatora je najpre uočen uticaj na razvoj mehura, a potom i uticaj na resorpciju žumanceta i pojava nekroze jetre, kao indikatora hepatotoksičnosti. Sa druge strane, ni u jednoj primenjenoj kombinaciji ispitivanih imunomodulatoara nije uočena pojava perikardijalnog edema, odnosno znakova kardiotoksičnosti. Dok pojedinačna primena SFN ne dovodi do pojave perikardijalnog edema, PA-MSHA u koncentraciji od $6,15 \times 10^6$ ćelija/ml izaziva

kardiotoksičnost. Međutim, pri kombinovanoj primeni, izostanak kardiotoksičnosti, bi se mogao pripisati kardioprotektivnom dejstvu izotiocijanata. Istraživanje Boneto i sar. (2022) pokazalo je da intraperitonealna primena SFN u dozi od 5 mg/kg t.m./dan tokom 25 dana poboljšava kardijačnu funkciju nakon infarkta miokarda kod miševa (46). Jedan od predloženih mehanizama jeste i aktivacija Nrf2 signalnog puta kojim SFN ostvaruje antiinflamatorno i antioksidativno delovanje (155). Koncentraciono-zavisni efekat uočen je pri ispitivanju teratogenosti, pri čemu su malformacije embriona zabeležene pri primeni 3 µg/ml SFN i 0,25% PA-MSHA ($4,5 \times 10^6$ ćelija/ml), dok su modelovanjem odnosa koncentracija-odgovor, izračunate koncentracije SFN (4,69 µg/ml) i PA-MSHA ($5,92 \times 10^6$ ćelija/ml) koje mogu dovesti do pojave teratogenih efekata pri kombinovanom tretmanu.

5.3.3.2. Subakutna toksičnost na modelu pacova

5.3.3.2.1. Unos vode, hrane, relativna masa organa i prirast telesne mase

Kao i u slučaju pojedinačne primene imunomodulatora, rezultati prirasta telesne mase mužjaka pacova pokazuju da je u grupi koja je tretirana najvišim dozama SFN i PA-MSHA (MIX 3) nakon 7. i 21. dana zabeležen statistički značajan porast telesne mase od 14% i 27%, redom. Suprotno tome, kao i u grupama tretiranim samo SFN, odnosno PA-MSHA, kod ženki pacova je zabeleženo smanjene telesne mase u MIX 1 i MIX 2 i to u svim vremenskim periodima, dok je u grupi MIX 3 jedino statistički značajno smanjenje telesne mase uočeno 21. dana tretmana. Unos hrane i vode varirao je tokom trajanja eksperimenta pri čemu su mužjaci unosili značajno više vode i hrane od kontrole, dok je kod tretiranih ženki pacova razlika u odnosu na kontrolu bila manje izražena. Kao što je prethodno objašnjeno pojedinačni imunomodulatori mogu dovesti do smanjenja telesne mase tretiranih ženki pacova uticajem na različite metaboličke procese. Posledično, i njihova kombinacija izaziva slične promene. Međutim, zabeleženo je isto smanjenje telesne mase tretiranih životinja pri primeni SFN i PA-MSHA pojedinačno, i u kombinaciji. Kombinovana primena SFN i PA-MSHA nije dovela do značajnih promena relativnih masa organa ni kod mužjaka ni kod ženki pacova, kao ni primena pojedinačnih imunomodulatora. Jedina statistički značajna razlika kod mužjaka uočena je na nivou pluća gde je tretman doveo do povećanja relativne mase posmatranog organa u sve 3 tretirane grupe. Kod ženki pacova došlo je do blagog uvećanja slezine, pri čemu je jedino statistički značajno uvećanje u odnosu na kontrolu primećeno u grupi 1 (MIX 1).

5.3.3.2.2. Hematološki i biohemijski parametri

Kod tretiranih ženki pacova uočene su značajnije promene hematoloških parametara u odnosu na mužjake, diktirane inaktivisanom bakterijom *Pseudomonas aeruginosa* koja je i pri pojedinačnoj primeni izazvala slične promene. Kod mužjaka pacova uočen je trend porasta broja i % limfocita u krvi, ali je jedino statističko značajno povećanje dobijeno u MIX 1 grupi u kojoj je % limfocita bio viši u odnosu na kontrolu. U istoj grupi zabeleženo je smanjenje % neutrofila i eozinofila, kao i smanjenje bazofila u poređenju sa kontrolom. Parametri anemije i to broj eritrocita, hemioglobin, hematokrit, MCHC, koncentracija gvožđa i TIBC bili su niži u MIX 2 i MIX 3 grupi u odnosu na MIX 1, ali ne i kontrolu. Drugim rečima, kombinovana primena SFN i PA-MSHA ne dovodi do anemije za razliku od pojedinačne primene inaktivisane bakterije, već u najnižim dozama (0,5 mg/kg t.m./dan i $0,09 \times 10^9$ ćelija/ml) može čak izazvati značajno povećanje pomenutih parametara. Suprotno tome, kod ženki pacova, uočeno je smanjenje broja eritrocita u svim tretiranim grupama u odnosu na kontrolu, praćen smanjenjem koncentracije hemoglobina i hematokrita, kao i porastom MCH i MCHC vrednosti. Međutim, nivo gvožđa i TIBC bili

su povišeni samo u MIX 1 grupi u odnosu na kontrolu. Ovo je karakteristično za megaloblastičnu anemiju, koja najčešće nastaje kao posledica nedostatka vitamina B12 ili folne kiseline (249). Uočen efekat može se pripisati dejstvu PA-MSHA koji je i sam doveo do sličnih promena u krvi tretiranih ženki pacova.

Ostali biohemijski parametri praćeni u ovoj doktorskoj disertaciji, kod mužjaka pacova, nisu pokazali značajne razlike u odnosu na kontrolu. Naime, uočen je statistički značajan porast ukupnog i HDL holesterola u svim tretiranim grupama, dok je od parametara funkcije jetre jedino nivo ukupnih proteina bio povišen i to samo u MIX 1 grupi. Funkcija bubrega, takođe, je bila očuvana s obzirom da je samo nivo mokraćne kiseline i kalcijum bio povišen u MIX 1 grupi u odnosu na kontrolu. Kod ženki pacova, kao i pri pojedinačnoj primeni PA-MSHA, dobijen je porast nivoa LDL holesterola, a smanjenje triglicerida u tretiranim grupama u odnosu na kontrolu. Dodatno, smanjenje koncentracije kreatinina, mokraćne kiseline, kalcijuma, neorganskog fosfora i magnezijuma u svim tretiranim grupama može ukazivati na ranu fazu hroničnog oštećenja bubrega (250). Međutim, ni za jedan od pomenutih parametara nije uočena doza-zavisnost modelovanjem odnosa doza-odgovor.

5.3.3.2.3. Nivoi hormona

Jedina promena uočena kod pacova tretiranih kombinacijom ispitivanih imunomodulatora bila je na nivou T4 hormona i to kod mužjaka pacova. Naime, uočen je statistički značajan porast u svim tretiranim grupama u odnosu na kontrolu, koji nije bio doza-zavistan, niti je doveo do poremećaja odnosa T3/T4 hormona u serumu. Ispitivani imunomodulatori, pojedinačno i u kombinaciji, u primenjenim dozama ne dovode do značajnih promena na nivou praćenih hormona.

5.3.3.2.4. Produkcija proteina

Dok je SFN prvenstveno stimulisao produkciju Nrf2 i HO-1, a PA-MSHA pro- i antiinflamatorne citokine, efekat kombinovane primene imunomodulatora na ispitivane proteine kod mužjaka i ženki pacova, bio je od manjeg značaja zbog velike standardne devijacije u okviru grupa. Uočen je trend rasta i pro- i antiinflamatornih citokina, koji nije zavisio od primenjenih doza. Tako je, na primer, kombinovana primena SFN i PA-MSHA dovela do porasta nivoa INF γ kod pacova oba pola, bez značajnih promena na nivou TNF α . Ovo je samo delimično u skladu sa dobijenim *in silico* rezultatima budući da PA-MSHA stimuliše ekspresiju oba citokina, a SFN inhibira IFN γ , dok na TNF α deluje dvojako. Iz priloženog se može pretpostaviti da primenjena doza SFN u kombinaciji sa PA-MSHA nije dovoljno visoka da ublaži efekte inaktivisane bakterije na nivou IFN γ , kao što ni primenjena doza PA-MSHA nije dovoljno visoka da dovede do promene nivoa TNF α , ni pri pojedinačnoj primeni, niti u kombinaciji. Budući da je povećanje sekrecije IFN γ u osnovi antitumorskog efekta inaktivisane bakterije *Pseudomonas aeruginosa* (101-103), ali se dovodi i u vezu sa pojavom štetnih efekata posredovanih inflamacijom (85, 113), dobijeni rezultat može se tumačiti i kao pozitivan i kao negativan efekat kombinovane primene imunomodulatora. Dodatno, dobijeni rezultati mogu ukazivati i na veću osetljivost IFN γ na inaktivisanu bakteriju u odnosu na TNF α , kao i na izraženije dejstvo PA-MSHA na imunski sistem u odnosu na SFN kada se primenjuju u dozama do 5 mg/kg t.m./dan SFN i $0,36 \times 10^9$ ćelija/ml PA-MSHA. Dodatno, kod tretiranih ženki pacova, uočeno je smanjenje IL-10 u svim tretiranim grupama. Isti trend uočen je i kod ženki tretiranih samo SFN, ali nije bio statistički značajan. To može ukazivati da je PA-MSHA pojačao SFN-indukovane efekte na nivou IL-10 citokina. Budući da se aktivacijom imunskog sistema pokreće niz kompleksnih interakcija u organizmu, neophodno je dalje

ispitati i razjasniti uticaj kombinovane primene imunomodulatora na njegove funkcije sagledavanjem većeg broja pro- i antiinflamatornih citokina.

5.3.3.2.5. Oksidativna oštećenja tkiva i patohistološka analiza

Parametri oksidativnog statusa, takođe, ukazuju na veću osetljivost ženki pacova na primenjen kombinovani tretman. Tako je, u tkivu bubrega tretiranih ženki pacova uočen porast nivoa parametara oksidativnog stresa, ali i antioksidativne zaštite što može biti razlog za prethodno opisane promene na nivou biohemijskih parametara funkcije bubrega. Pored toga, u tkivu timusa uočen je porast IMA, MDA, ali i SOD, analogno rezultatima dobijenim kod ženki tretiranih samo PA-MSHA. Dodatno, patohistološka analiza pokazala je da nakon kombinovanog tretmana imunomodulatorima, tkivo timusa ženki pacova nije oštećeno. Zatim, kombinovana primena imunomodulatora kod pacova oba pola dovela je do slabljenja odbrambene sposobnosti pluća od slobodnih radikala što se karakteriše smanjenjem nivoa GSH u svim tretiranim grupama nezavisno od primenjene doze, što je u skladu sa prethodno primećenom osetljivošću mehura kod embriona zebrica. Suprotno tome, u tkivu srca pacova zabeležen je statistički značajan porast parametara antioksidativne zaštite, GSH i SOD kod pacova oba pola što se može objasniti kardioprotektivnim dejstvom SFN. Takođe, patohistološka analiza tkiva jetre i slezine pokazala je da kombinovana primena imunomodulatora ne dovodi do značajnih oštećenja ispitivanih tkiva. Dodatno, uočeno je da iako primena PA-MSHA pojedinačno dovodi do smanjenja deponovanja glikogena u PA-MSHA 2 i PA-MSHA 3 grupi mužjaka pacova, a SFN do porasta ukupnog mikroskopskog oštećenja jetre u najvišoj ispitivanoj dozi, njihova kombinacija ne izaziva ove promene. Kod ženki pacova, smanjenje deponovanja glikogena i porast ukupnog mikroskopskog oštećenja uočeno je u PA-MSHA 3 grupi, ali ne i u grupama tretiranim kombinacijom SFN i PA-MSHA zahvaljujući protektivnim dejstvom SFN. U tkivu slezine nisu zabeležene značajne patohistološke promene pri primeni SFN i PA-MSHA pojedinačno, i u kombinaciji. Jedini kriterijum koji je značajno promenjen u slezini, i to povećan u MIX 2 grupi mužjaka pacova u poređenju sa kontrolnom bio je broj limfoidnih folikula. Međutim, uočena promena nije dovela do značajnog povećanja nivoa limfocita u krvi tretiranih pacova. U crvenoj pulpi slezine mužjaka pacova značajna promena uočena je u broju histiocita, koji su bili viši u MIX 3 grupi u odnosu na kontrolu što je praćeno povećanjem produkcije proinflamatornih citokina i to: CXCL1, IL-2 i IL-6.

5.4. Kritični toksični efekti

Modelovanjem odnosa doza odgovor kod tretiranih pacova, dobijena je dozna zavisnost hematoloških i biohemijskih parametara, nivoa hormona, citokina i drugih proteina, kao i parametara oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite za SFN i PA-MSHA. Poređenjem BMD vrednosti za pojedinačne imunomodulatore došlo se do najnižih izračunatih vrednosti BMD među praćenim efektima koji predstavljaju kritični toksični efekat.

Od hematoloških parametara, dozno-zavisni odgovor pri primeni SFN kod mužjaka pacova dobijen je za procenat i broj limfocita, kao i procenat neutrofila pri čemu je najniža BMDL vrednost dobijena za procenat neutrofila. Primena SFN u dozi od 0,0105 mg/kg t.m./dan dovodi do smanjenja broja neutrofila u krvi mužjaka pacova i predstavlja kritični toksični efekat, imajući u vidu da se smanjenjem broja neutrofila, smanjuje i antiinflamatorna zaštita organizma (252). S druge strane, kod ženki pacova tretiranih rastućim dozama SFN, najniža BMDL vrednost dobijena je za koncentraciju SH grupa u bubrezima pri čemu je uočeno da primena 0,00054 mg/kg t.m./dan SFN može dovesti do 5% povećanja njihove koncentracije stimulišući tako mehanizme antioksidativne zaštite u bubrezima (253).

Inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* dovela je do dozno-zavisne promene većeg broja parametara i kod mužjaka i kod ženki pacova. Međutim dozno-zavisni efekti na nivou produkcije proteina identifikovani su kao kritični toksični efekti. Dok je, kod mužjaka tretiranih pacova uočen pozitivan trend rasta koncentracije TGFβ pri primeni $0,000162 \times 10^9$ ćelija/ml PA-MSHA, kod ženki je zabeleženo da primena $0,00287 \times 10^9$ ćelija/ml dovodi do dozno-zavisnog porasta koncentracije IFNγ. Imajući u vidu postojanje polno-specifičnih razlika u imunskog odgovora, pri čemu testosteron stimuliše oslobađanje TGFβ, a Th1 ćelije koje su brojnije kod ženki produkciju i sekreciju IFNγ (254), dobijen rezultat bio je u skladu sa očekivanjima.

Uticaj na citokine može se smatrati i pozitivnim i negativnim efektom tretmana. Naime, visok nivo TGFβ detektuje se u ćelijama tumora kolona i dojke i dovodi se u vezu sa pojavom metastaza u kasnijim fazama bolesti (255, 256). Međutim, sa druge strane, visok nivo TGFβ sprečava prekomernu aktivaciju imunskog sistema i time štiti organizam od inflamatornih patoloških stanja (257). Dodatno, TGFβ stimuliše proliferaciju fibroblasta i uključen je u proces normalnog zarastanja rana (258). Slično tome, pokazano je da IFNγ doprinosi aktivaciji imunskog odgovora i ostvaruje antitumorske efekte (259), kao i da posreduje u zaštiti ćelija od intracelularnih patogena, virusa i bakterija (260). Međutim, prekomerna produkcija proinflamatornih citokina, kao što je IFNγ može dovesti do hronične inflamacije koja je u osnovi brojnih oboljenja (261).

6. ZAKLJUČCI

Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da pojedinačna, kao i kombinovana primena ispitivanih imunomodulatora, SFN i PA-MSHA izaziva različite toksične efekte, pri čemu su izvedeni sledeći zaključci:

- *In silico* analizom pokazano je da molekul SFN poseduje dve toksofore (izocijanat i izotiocijanat) u strukturi koje mogu dovesti do oštećenja hromozoma ili doprineti senzibilizaciji kože, kao i da SFN utiče na gene uključene u regulaciju imunskog odgovora, oksidativnog statusa i apoptoze, pre svega *Nrf2*, *HO-1*, *IFNG*, *TNF*, *CASP3*.
- PA-MSHA utiče na gene uključene u proces regulacije imunskog odgovora i apoptoze.
- Kombinovana primena SFN i PA-MSHA utiče na 13 zajedničkih gena uključenih u procese funkcionisanja imunskog sistema i apoptoze, pri čemu PA-MSHA stimuliše ekspresiju *IFNG* i *TNF*, dok SFN inhibira *IFNG*, a deluje dvojako na nivou *TNF*.
- *In vitro* ispitivanjem SFN ostvaruje citotoksičan efekat na ćelije karcinoma kolona zaustavljanjem ćelijskog ciklusa u G2/M fazi. HCT-116 ćelije pokazuju veću osetljivost na SFN u odnosu na HT-29.
- PA-MSHA ne pokazuje citotoksičnost *in vitro* budući da izaziva smrt 8,2%, odnosno 19% HCT-116 i HT-29 ćelija, redom.
- Citotoksični efekat kombinovane primene imunomodulatora je niži u odnosu na efekat dobijen primenom samo SFN pri čemu je ćelijska linija HCT-116 pokazala veću osetljivost od HT-29.
- U *in vivo* ispitivanju na embrionima zebrica srednja letalna koncentracija SFN iznosi 14,8 µg/ml, hepatotoksična BMCL 6,85 µg/ml, dok je najniža BMCL koncentracija dobijena za efekat na razvoj mehura 3,2 µg/ml.
- Srednja letalna koncentracija PA-MSHA za embrione zebrica iznosi $4,7 \times 10^7$ ćelija/ml. Izračunata BMCL za efekat na razvoj mehura je $7,78 \times 10^6$ ćelija/ml, dok je BMCL za hepato-, kardiotoksičnosti i teratogenost kod embriona zebrica jednaka i iznosi $6,15 \times 10^6$ ćelija/ml.
- Kombinovana primena SFN i PA-MSHA indukuje štetne efekte na embrionima zebrice u koncentracijama u kojima pojedinačne supstance nisu ispoljile štetan efekat. SFN i PA-MSHA u kombinacijama koncentracija od 5 µg/ml SFN i do 0,1% ($1,8 \times 10^6$) ćelija/ml PA-MSHA, odnosno 0,3% ($5,4 \times 10^6$ ćelija/ml) PA-MSHA i do 1 µg/mL SFN nisu izazvale štetne efeke.
- U *in vivo* ispitivanju na pacovima SFN dovodi do promena na nivou hematoloških i biohemijskih parametara, utiče na produkciju proteina i parametre oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite kod mužjaka i ženki pacova.
- Aktivacija *Nrf2*/*HO-1* signalnog puta i promene antioksidativne sposobnosti mogu biti u osnovi pozitivnih ali i negativnih efekata SFN.
- Granični nivo toksičnosti SFN za smanjenje procenta neutrofila kod mužjaka pacova iznosi 0,0105 mg/kg t.m./dan na osnovu izračunate BMDL vrednosti, dok kod ženki pacova primena 0,00054 mg/kg t.m./dan SFN dovodi do povećanja koncentracije SH grupa u bubrezima.
- Ženke pacova su osetljivije na dejstvo PA-MSHA u pogledu hematoloških i biohemijskih parametara koji odražavaju funkciju bubrega. PA-MSHA dovodi do razvoja anemije i oštećenja bubrega kod tretiranih ženki, ali ne i mužjaka pacova.

- PA-MSHA izaziva promene na nivou tiroidnih hormona ali ne remeti ukupnu hormonsku ravnotežu štitaste žlezde.
- Povećanje i pro- i antiinflamatornih citokina i kod mužjaka i ženki pacova, pre svega IFN γ i TGF β , kao i smanjenje oksidativne zaštite može biti u osnovi toksičnih mehanizama PA-MSHA.
- Granični nivo toksičnosti PA-MSHA za povećanje koncentracije TGF β kod mužjaka pacova iznosi $0,000162 \times 10^9$ ćelija/ml na osnovu izračunate BMDL vrednosti, dok kod ženki pacova primena $0,00287 \times 10^9$ ćelija/ml PA-MSHA dovodi do povećanja koncentracije IFN γ .
- Ženke pacova osetljivije su na dejstvo kombinovane primene ispitivanih imunomodulatora. Kombinovana primena, kao i pojedinačna primena PA-MSHA može dovesti do pojave anemije i/ili slabljenja bubrežne funkcije kod ženki, ali ne i mužjaka pacova.
- Kombinovana primena imunomodulatora dovodi do promena antioksidativne sposobnosti pluća i kod mužjaka i kod ženki pacova, odnosno aktivnost GSH.
- Kombinovana primena ne dovodi do smanjenja deponovanja glikogena u jetri tretiranih pacova, ni do povećanja ukupnog mikroskopskog oštećenja, odnosno do promena uočenih pri pojedinačnoj primeni SFN i PA-MSHA.
- *Benchmark* doze za efekte kombinovane primene imunomodulatora SFN i PA-MSHA praćeni tokom ispitivanja subakutne toksičnosti kod pacova nisu utvrđene.

Sumarno, dobijeni rezultati ukazuju na to da ispitivani imunomodulatori pojedinačno i pri kombinovanoj primeni utiču na imunski odgovor dejstvom na IFN γ *in silico* i *in vivo*, kao i na apoptozu *in vitro*, što može biti u osnovi njihovih pozitivnih, ali i negativnih efekata. Uticaj na razvoj mehura predstavlja kritičan toksični efekat na embrionima zebrica za SFN, a za PA-MSHA su to malformacije embriona zebrica, kardiotoksičnost i hepatotoksičnost. Kombinovana primena SFN i PA-MSHA indukuje štetne efekte na embrionima zebrice u koncentracijama u kojima pojedinačne supstance nisu ispoljile štetan efekat. Praćeni efekti (hematološki, biohemijski parametri, nivoi hormona, produkcija citokina i drugih proteina i parametri oksidativnog stresa) u *in vivo* ispitivanju na pacovima pokazuju doznu-zavisnost. Kritičan toksični efekat SFN je smanjenje procenta neutrofila, a za PA-MSHA povećanje koncentracije transformišućeg faktora beta kod mužjaka pacova. Dodatno, rezultati ispitivanja na eksperimentalnim životinjama pokazuju da su efekti kombinovane primene SFN i PA-MSHA slični efektima pojedinačne primene PA-MSHA. SFN je umanjio štetne efekte PA-MSHA na nivou jetre, kao što je smanjenje deponovanja glikogena, ali ne i štetne efekte na parametre anemije i bubrega pri kombinovanoj primeni. Dobijeni rezultati razjašnjavaju mehanizme toksičnosti pojedinačne i kombinovane primene ispitivanih imunomodulatora, a utvrđeni granični nivoi toksičnosti za pojedinačne imunomodulatore predstavljaju osnovu za dalji odabir doza pri njihovoj kombinovanoj primeni.

7. LITERATURA

1. World Health Organization, (2021). Global Health Observatory. Geneva: World Health Organization; 2018. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, accessed [10 October 2021]
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: Cancer Journal for Clinicians* 68.6, 394-424.
3. Dagenais GR, Leong D, Rangarajan S, Lanas F, Lopez-Jaramillo P, Gupta R, et al. (2019). Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *The Lancet*.
4. Ma W, Gilligan B, Yuan J, Li T (2016). Current status and perspectives in translational biomarker research for PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade therapy. *Journal of Hematology & Oncology* 9.1, 47.
5. Wang RF, Wang HY (2017). Immune targets and neoantigens for cancer immunotherapy and precision medicine. *Cell Research* 27.1, 11.
6. Jiang T, Shi T, Zhang H, Hu J, Song Y, Wei J, Ren S, Zhou C (2019). Tumor neoantigens: from basic research to clinical applications. *Journal of Hematology & Oncology* 12.1, 93.
7. Mohamed SIA, Jantan I, Haque MA (2017). Naturally occurring immunomodulators with antitumor activity: an insight on their mechanisms of action. *International Immunopharmacology*, 50, 291-304.
8. Pan P, Huang YW, Oshima K, Yearsley M, Zhang J, Arnold M, et al. (2019). The immunomodulatory potential of natural compounds in tumor-bearing mice and humans. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(6), 992-1007.
9. Soundararajan P, Kim JS (2018). Anti-carcinogenic glucosinolates in cruciferous vegetables and their antagonistic effects on prevention of cancers. *Molecules*, 23(11), 2983.
10. Ma Y, Zeng C, Hou P, Wei T, Zhu J, Gong R, Li Z. *Pseudomonas aeruginosa* injection decreases drainage in lateral neck dissection for metastatic thyroid cancer. *Gland Surg.* 2020 Oct;9(5):1543-1550.
11. Bozic D, Baralić K, Živančević K, Miljković EA, Ćurčić M, Antonijević B, et al. Predicting sulforaphane-induced adverse effects in colon cancer patients via *in silico* investigation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022 Feb;146(112598).
12. Hu C, Huang Z, Sun B, Liu M, Tang L, Chen L. Metabolomic profiles in zebrafish larvae following probiotic and perfluorobutanesulfonate coexposure. *Environmental Research*. 2022 Mar;204(112380).
13. Gu H feng, Mao X ying, Du M. Metabolism, absorption, and anti-cancer effects of sulforaphane: An update. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021 Jan 4;62(13):3437–52.
14. Hu K, Qi Y jie, Zhao J, Jiang H fei, Chen X, Ren J. Synthesis and biological evaluation of sulforaphane derivatives as potential antitumor agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013 Jun;64(3):529–39.
15. Iahtisham-UI-Haq, Khan S, Awan KA, Iqbal MJ. Sulforaphane as a potential remedy against cancer: Comprehensive mechanistic review. *Journal of Food Biochemistry*. 2021 Aug 5;46(3).
16. Kaiser AE, Baniasadi M, Giansiracusa D, Giansiracusa M, Garcia M, Fryda Z, et al. Sulforaphane: A Broccoli Bioactive Phytochemical with Cancer Preventive Potential. *Cancers*. 2021 Sep 25;13(19):4796.

17. Liang J, Hänsch GM, Hübner K, Samstag Y. Sulforaphane as anticancer agent: A double-edged sword? Tricky balance between effects on tumor cells and immune cells. *Advances in Biological Regulation*. 2019 Jan;71(1):79–87.
18. Rafiei H, Ashrafizadeh M, Ahmadi Z. MicroRNAs as novel targets of sulforaphane in cancer therapy: The beginning of a new tale? *Phytotherapy Research*. 2020 Jan 23;34(4):721–8.
19. Sestili P, Fimognari C. Cytotoxic and Antitumor Activity of Sulforaphane: The Role of Reactive Oxygen Species. *BioMed Research International*. 2015;2015(1):1–9.
20. Baralić K, Živanović J, Marić Đ, Božić D, Grahovac L, Antonijević Miljaković E, et al. Sulforaphane—A Compound with Potential Health Benefits for Disease Prevention and Treatment: Insights from Pharmacological and Toxicological Experimental Studies. *Antioxidants*. 2024 Jan 25;13(2):147.
21. Houghton CA, Fassett RG, Coombes JS. Sulforaphane and Other Nutrigenomic Nrf2 Activators: Can the Clinician's Expectation Be Matched by the Reality? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016(1):1–17.
22. Russo M, Spagnuolo C, Russo GL, Skalicka-Woźniak K, Daglia M, Sobarzo-Sánchez E, et al. Nrf2 targeting by sulforaphane: A potential therapy for cancer treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017 Jul 21;58(8):1391–405.
23. Bai Y, Wang X, Zhao S, Ma C, Cui J, Zheng Y. Sulforaphane Protects against Cardiovascular Disease via Nrf2 Activation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015;2015(1):1–13.
24. Su X, Jiang X, Meng L, Dong X, Shen Y, Xin Y. Anticancer Activity of Sulforaphane: The Epigenetic Mechanisms and the Nrf2 Signaling Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018 Jun 6;2018(1):1–10.
25. Schepici G, Bramanti P, Mazzon E. Efficacy of Sulforaphane in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 Nov 16;21(22):8637.
26. Mahn A, Castillo A. Potential of Sulforaphane as a Natural Immune System Enhancer: A Review. *Molecules*. 2021 Feb 1;26(3):752.
27. Georgikou C, Yin L, Gladkich J, Xiao X, Sticht C, Torre C de la, et al. Inhibition of miR30a-3p by sulforaphane enhances gap junction intercellular communication in pancreatic cancer. *Cancer Letters*. 2020 Jan;469(1):238–45.
28. Ishiura Y, Ishimaru H, Watanabe T, Fujimuro M. Sulforaphane Exhibits Cytotoxic Effects against Primary Effusion Lymphoma Cells by Suppressing p38 MAPK and AKT Phosphorylation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2019 Dec 1;42(12):2109–12.
29. Xu Y, Han X, Li Y, Min H, Zhao X, Zhang Y, et al. Sulforaphane Mediates Glutathione Depletion via Polymeric Nanoparticles to Restore Cisplatin Chemiosensitivity. *ACS Nano*. 2019 Oct 31;13(11):13445–55.
30. Lin LC, Yeh CT, Kuo CC, Lee CM, Yen GC, Wang LS, et al. Sulforaphane Potentiates the Efficacy of Imatinib against Chronic Leukemia Cancer Stem Cells through Enhanced Abrogation of Wnt/ β -Catenin Function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012 Jul 3;60(28):7031–9.
31. Carrasco-Pozo C, Tan KN, Rodriguez T, Avery VM. The Molecular Effects of Sulforaphane and Capsaicin on Metabolism upon Androgen and Tip60 Activation of Androgen Receptor. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019 Oct 29;20(21):5384.
32. Clarke JD, Dashwood RH, Ho E. Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer Letters*. 2008 Oct;269(2):291–304.
33. Castro NP, Rangel MC, Merchant AS, MacKinnon G, Cuttitta F, Salomon DS, et al. Sulforaphane Suppresses the Growth of Triple-negative Breast Cancer Stem-like Cells *In vitro* and *In vivo*. *Cancer Prevention Research*. 2019 Mar 1;12(3):147–58.

34. Tsubura A. Sulforaphane inhibits the growth of KPL-1 human breast cancer cells *in vitro* and suppresses the growth and metastasis of orthotopically transplanted KPL-1 cells in female athymic mice. *Oncology Reports*. 2011 May 20;26(3):603–8.
35. Lu Z, Ren Y, Yang L, Jia A, Hu Y, Zhao Y, et al. Inhibiting autophagy enhances sulforaphane-induced apoptosis via targeting NRF2 in esophageal squamous cell carcinoma. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2021 May;11(5):1246–60.
36. Chen X, Jiang Z, Zhou C, Chen K, Li X, Wang Z, et al. Activation of Nrf2 by Sulforaphane Inhibits High Glucose-Induced Progression of Pancreatic Cancer via AMPK Dependent Signaling. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;50(3):1201–15.
37. Rai R, Gong Essel K, Mangiaracina Benbrook D, Garland J, Daniel Zhao Y, Chandra V. Preclinical Efficacy and Involvement of AKT, mTOR, and ERK Kinases in the Mechanism of Sulforaphane against Endometrial Cancer. *Cancers*. 2020 May 18;12(5):1273.
38. Rudzinska-Radecka M, Janczewski Ł, Gajda A, Godlewska M, Chmielewska-Krzesinska M, Wasowicz K, et al. The Anti-Tumoral Potential of Phosphonate Analog of Sulforaphane in Zebrafish Xenograft Model. *Cells*. 2021 Nov 18;10(11):3219.
39. Kamal MM, Akter S, Lin CN, Nazzal S. Sulforaphane as an anticancer molecule: mechanisms of action, synergistic effects, enhancement of drug safety, and delivery systems. *Archives of Pharmacal Research*. 2020 Mar 10;43(4):371–84.
40. Mangla B, Javed S, Sultan MH, Kumar P, Kohli K, Najmi A, et al. Sulforaphane: A review of its therapeutic potentials, advances in its nanodelivery, recent patents, and clinical trials. *Phytotherapy Research*. 2021 Jun 28;35(10):5440–58.
41. Zhang Y, Wu Q, Liu J, Zhang Z, Ma X, Zhang Y, et al. Sulforaphane alleviates high fat diet-induced insulin resistance via AMPK/Nrf2/GPx4 axis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022 Aug;152(113273).
42. Axelsson AS, Tubbs E, Mecham B, Chacko S, Nenonen HA, Tang Y, et al. Sulforaphane reduces hepatic glucose production and improves glucose control in patients with type 2 diabetes. *Science Translational Medicine*. 2017 Jun 14;9(394).
43. Khaleel SA, Raslan NA, Alzokaky AA, Ewees MG, Ashour AA, Abdel-Hamied HE, et al. Contrast media (meglumine diatrizoate) aggravates renal inflammation, oxidative DNA damage and apoptosis in diabetic rats which is restored by sulforaphane through Nrf2/HO-1 reactivation. *Chemico-Biological Interactions*. 2019 Aug;309(108689).
44. Li S, Yang H, Chen X. Protective effects of sulforaphane on diabetic retinopathy: activation of the Nrf2 pathway and inhibition of NLRP3 inflammasome formation. *Experimental Animals*. 2019;68(2):221–31.
45. Wang X, Chen X, Zhou W, Men H, Bao T, Sun Y, et al. Ferroptosis is essential for diabetic cardiomyopathy and is prevented by sulforaphane via AMPK/NRF2 pathways. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2022 Feb;12(2):708–22.
46. Poletto Bonetto JH, Luz de Castro A, Fernandes RO, Corssac GB, Cordero EA, Schenkel PC, et al. Sulforaphane Effects on Cardiac Function and Calcium-Handling-Related Proteins in 2 Experimental Models of Heart Disease: Ischemia-Reperfusion and Infarction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2022 Mar;79(3):325–34.
47. Jayakumar T, Chen WF, Lu WJ, Chou DS, Hsiao G, Hsu CY, et al. A novel antithrombotic effect of sulforaphane via activation of platelet adenylate cyclase: ex vivo and *in vivo* studies. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013 Jun;24(6):1086–95.
48. Babu PVA, Petersen C, Jia Z. Sulforaphane and Atherosclerosis. In: Reference Series in Phytochemistry [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [cited 2024 Mar 1]. p. 319–37. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-25462-3_11
49. Martins T, Colaço B, Venâncio C, Pires MJ, Oliveira PA, Rosa E, et al. Potential effects of sulforaphane to fight obesity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2018 Mar 7;98(8):2837–44.

50. Çakır I, Lining Pan P, Hadley CK, El-Gamal A, Fadel A, Elsayegh D, et al. Sulforaphane reduces obesity by reversing leptin resistance. *eLife*. 2022 Mar 24;11(1).
51. Masuda M, Yoshida-Shimizu R, Mori Y, Ohnishi K, Adachi Y, Sakai M, et al. Sulforaphane induces lipophagy through the activation of AMPK-mTOR-ULK1 pathway signaling in adipocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2022 Aug;106(109017).
52. Wang M, Chen M, Guo R, Ding Y, Zhang H, He Y. The improvement of sulforaphane in type 2 diabetes mellitus (T2DM) and related complications: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2022 Nov;129(1):397–407.
53. Kakarla R, Karuturi P, Siakabinga Q, Kasi Viswanath M, Dumala N, Guntupalli C, et al. Current understanding and future directions of cruciferous vegetables and their phytochemicals to combat neurological diseases. *Phytotherapy Research*. 2024 Jan 12;1(1).
54. Bahn G, Park JS, Yun UJ, Lee YJ, Choi Y, Park JS, et al. NRF2/ARE pathway negatively regulates BACE1 expression and ameliorates cognitive deficits in mouse Alzheimer's models. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019 Jun 4;116(25):12516–23.
55. Zhang R, Miao QW, Zhu CX, Zhao Y, Liu L, Yang J, et al. Sulforaphane Ameliorates Neurobehavioral Deficits and Protects the Brain From Amyloid β Deposits and Peroxidation in Mice With Alzheimer-Like Lesions. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*. 2014 Jul 13;30(2):183–91.
56. Hou TT, Yang HY, Wang W, Wu QQ, Tian YR, Jia JP. Sulforaphane Inhibits the Generation of Amyloid- β Oligomer and Promotes Spatial Learning and Memory in Alzheimer's Disease (PS1V97L) Transgenic Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2018 Mar 27;62(4):1803–13.
57. Pu D, Zhao Y, Chen J, sun Y, Lv A, Zhu S, et al. Protective Effects of Sulforaphane on Cognitive Impairments and AD-like Lesions in Diabetic Mice are Associated with the Upregulation of Nrf2 Transcription Activity. *Neuroscience*. 2018 Jun;381(161):35–45.
58. Jazwa A, Rojo AI, Innamorato NG, Hesse M, Fernández-Ruiz J, Cuadrado A. Pharmacological Targeting of the Transcription Factor Nrf2 at the Basal Ganglia Provides Disease Modifying Therapy for Experimental Parkinsonism. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011 Jun 15;14(12):2347–60.
59. Lee D, Clark ED, Antonsdottir IM, Porsteinsson AP. A 2023 update on the advancements in the treatment of agitation in Alzheimer's disease. *Expert Opin Pharmacother*. 2023 Apr;24(6):691–703.
60. Zhou Q, Chen B, Wang X, Wu L, Yang Y, Cheng X, et al. Sulforaphane protects against rotenone-induced neurotoxicity *in vivo*: Involvement of the mTOR, Nrf2 and autophagy pathways. *Scientific Reports*. 2016 Aug 24;6(1).
61. Bao B, Zhang M, Chen Z, Wu X, Xia Z, Chai J, et al. Sulforaphane prevents PC12 cells from oxidative damage via the Nrf2 pathway. *Molecular Medicine Reports*. 2019 Apr 10;19(6):4890–6.
59. Wang W, Wei C, Quan M, Li T, Jia J. Sulforaphane Reverses the Amyloid- β Oligomers Induced Depressive-Like Behavior. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2020 Oct 27;78(1):127–37.
62. Li B, Cui W, Liu J, Li R, Liu Q, Xie XH, et al. Sulforaphane ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by antagonizing oxidative stress and Th17-related inflammation in mice. *Experimental Neurology*. 2013 Dec;250(1):239–49.
63. Yoo IH, Kim MJ, Kim J, Sung JJ, Park ST, Ahn SW. The Anti-Inflammatory Effect of Sulforaphane in Mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Korean Medical Science*. 2019;34(28).
64. Morroni F, Tarozzi A, Sita G, Bolondi C, Zolezzi Moraga JM, Cantelli-Forti G, et al. Neuroprotective effect of sulforaphane in 6-hydroxydopamine-lesioned mouse model of Parkinson's disease. *NeuroToxicology*. 2013 May;36(1):63–71.
65. Živančević K, Bozic D, Baralić K, Ćurčić M, Antonijević Miljaković E, Antonijević B, et al. *In silico* prediction of physicochemical, pharmacokinetic and toxicological properties of sulforaphane. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*. 2022 Dec 31;68(03):331–2.

66. Socala K, Nieoczym D, Kowalczyk-Vasilev E, Wyska E, Wlaż P. Increased seizure susceptibility and other toxicity symptoms following acute sulforaphane treatment in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2017 Jul;326(1):43–53.
67. Paunkov A, Chartoumpekis DV, Ziros PG, Chondrogianni N, Kensler TW, Sykiotis GP. Impact of Antioxidant Natural Compounds on the Thyroid Gland and Implication of the Keap1/Nrf2 Signaling Pathway. *Current Pharmaceutical Design*. 2019 Aug 23;25(16):1828–46.
68. Rommasi F. Bacterial-Based Methods for Cancer Treatment: What We Know and Where We Are. *Oncology and Therapy*. 2021 Nov 15;10(1):23–54.
69. Sedighi M, Zahedi Bialvaei A, Hamblin MR, Ohadi E, Asadi A, Halajzadeh M, et al. Therapeutic bacteria to combat cancer; current advances, challenges, and opportunities. *Cancer Medicine*. 2019 Apr 5;8(6):3167–81.
70. Yang L, Li A, Wang Y, Zhang Y. Intratumoral microbiota: roles in cancer initiation, development and therapeutic efficacy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2023 Jan 16;8(1).
71. Zhao X, Wu X, Yu W, Cai X, Liu Q, Fu X, et al. PA-MSHA inhibits proliferation and induces apoptosis in human non-small cell lung cancer cell lines with different genotypes. *Molecular Medicine Reports*. 2016 Oct 20;14(6):5369–76.
72. Roberts NJ, Zhang L, Janku F, Collins A, Bai RY, Staedtke V, et al. Intratumoral injection of *Clostridium novyi* - NT spores induces antitumor responses. *Science Translational Medicine*. 2014 Aug 13;6(249).
73. Huang X, Pan J, Xu F, Shao B, Wang Y, Guo X, et al. Bacteria-Based Cancer Immunotherapy. *Advanced Science*. 2021 Feb 10;8(7).
74. Bozic D, Živanović J, Živančević K, Baralić K, Đukić-Ćosić D. Trends in Anti-Tumor Effects of *Pseudomonas aeruginosa* Mannose-Sensitive-Hemagglutinin (PA-MSHA): An Overview of Positive and Negative Effects. *Cancers*. 2024 Jan 25;16(3):524.
75. Zhou S, Gravekamp C, Bermudes D, Liu K. Tumour-targeting bacteria engineered to fight cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2018 Nov 7;18(12):727–43.
76. Faure E, Kwong K, Nguyen D. *Pseudomonas aeruginosa* in Chronic Lung Infections: How to adapt Within the Host? *Frontiers in Immunology*. 2018 Oct 22;9(1).
77. Arai H. Regulation and Function of Versatile Aerobic and Anaerobic Respiratory Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*. 2011;2(1).
78. Zhao Y, Zhang Y, Liu J. Regulatory effect of *Pseudomonas aeruginosa* mannose-sensitive hemagglutinin on inflammation and immune function in percutaneous nephrolithotomy patients with upper urinary tract calculi complicated with infection. *Frontiers in Immunology*. 2023 Jun 12;14(1).
79. Pang Z, Gu MD, Tang T. *Pseudomonas aeruginosa* in Cancer Therapy: Current Knowledge, Challenges and Future Perspectives. *Frontiers in Oncology*. 2022 Apr 28;12(1).
80. Xiu D, Cheng M, Zhang W, Ma X, Liu L. *Pseudomonas aeruginosa*-mannose-sensitive hemagglutinin inhibits chemical-induced skin cancer through suppressing hedgehog signaling. *Experimental Biology and Medicine*. 2020 Jan 5;245(3):213–20.
81. Hou J, Liu Y, Liu Y, Shao Y. The MSHA Strain of *Pseudomonas Aeruginosa* Activated TLR Pathway and Enhanced HIV-1 DNA Vaccine Immunoreactivity. *PLoS ONE*. 2012 Oct 15;7(10):e47724.
82. Zhang H, Shan W, Li D, Yan Y, Zhang J. PA-MSHA exerts potent activity against cetuximab-resistant colorectal cancer through miR-7-5p/Akt/Wnt-β-catenin pathway [Internet]. Research Square Platform LLC; 2022 Jul [cited 2024 Mar 4]. Available from: <https://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-1816082/v1>

83. Zhu H, Wang S, Shen L, Wang W, Zhao F, Cao T. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* mannose-sensitive hemagglutinin (PA-MSHA) pretreatment on septic rats. *International Immunopharmacology*. 2013 Nov;17(3):836–42.
84. Xu WH, Liu ZB, Hou YF, Hong Q, Hu DL, Shao ZM. Inhibition of autophagy enhances the cytotoxic effect of PA-MSHA in breast cancer. *BMC Cancer*. 2014 Apr 21;14(1).
85. Gong Y, Zuo H, Zhou Y, Yu KD, Liu GY, Di GH, et al. Neoadjuvant *Pseudomonas aeruginosa* mannose-sensitive hemagglutinin (PA-MSHA) and chemotherapy versus placebo plus chemotherapy in patients with HER2-negative breast cancer: a randomized, controlled, double-blind trial. *Annals of Translational Medicine*. 2023 Mar;11(6):243–243.
86. Jian X, Chao S, Xiaoli Z, Aiwu W. Inactivated *P. aeruginosa* restores immune imbalance of chronic idiopathic urticaria. *Archives of Dermatological Research*. 2019 Dec 3;312(5):353–9.
87. Wang C, Hu Z, Zhu Z, Zhang X, Wei Z, Zhang Y, et al. The MSHA strain of *Pseudomonas aeruginosa* (PA-MSHA) inhibits gastric carcinoma progression by inducing M1 macrophage polarization. *Tumor Biology*. 2015 Dec 11;37(5):6913–21.
88. Zhao X min, Pan S yun, Huang Q ling, Lu Y ni, Wu X hua, Chang JH, et al. PA-MSHA in combination with EGFR tyrosine kinase inhibitor: A new strategy to overcome the drug resistance of non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget*. 2016 Jun 7;7(31):49384–96.
89. Liu Z, Hou Y, Dong M, Di G, Wu J, Shen Z, et al. 0015 PA-MSHA inhibits proliferation and induces apoptosis through the up-regulation and activation of caspases in the human breast cancer cell lines. *The Breast*. 2009 Mar;18(1):S22.
90. Wei Y, Liu D, Jin X, Gao P, Wang Q, Zhang J, et al. PA-MSHA inhibits the growth of doxorubicin-resistant MCF-7/ADR human breast cancer cells by downregulating Nrf2/p62. *Cancer Medicine*. 2016 Oct 18;5(12):3520–31.
91. Yin T qiu, Ou-yang X, Jiao F yan, Huang L ping, Tang X dong, Ren B qiong. *Pseudomonas aeruginosa* mannose-sensitive hemagglutinin inhibits proliferation and invasion via the PTEN/AKT pathway in HeLa cells. *Oncotarget*. 2016 May 19;7(24):37121–31.
92. Zhu YP, Bian XJ, Ye DW, Yao XD, Zhang SL, Dai B, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-mannose-sensitive hemagglutinin inhibits proliferation and induces apoptosis in a caspase-dependent manner in human bladder cancer cell lines. *Oncology Letters*. 2013 Feb 19;5(4):1357–62.
93. Cao Z, Shi L, Li Y, Wang J, Wang D, Wang G, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Mannose Sensitive Hemagglutinin Inhibits the Growth of Human Hepatocarcinoma Cells via Mannose-Mediated Apoptosis. *Digestive Diseases and Sciences*. 2008 Dec 4;54(10):2118–27.
94. Wei H, Mao Y, Zhang H, Wu F, Zhang Y. PA-MSHA Regulates PD-L1 Expression in Hepatoma Cells. *Immunological Investigations*. 2023 Feb 10;52(3):343–63.
95. Jiang Y, Chen M, Nie H, Yuan Y. PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2019 Mar 19;15(5):1111–22.
96. Zhang Z, Wang LP, Zhao XL, Wang F, Huang L, Wang M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* injection enhanced antitumor cytotoxicity of cytokine-induced killer cells derived from cord blood. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2014 Oct;68(8):1057–63.
97. Zhang M, Luo F, Zhang Y, Wang L, Lin W, Yang M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Mannose-Sensitive Hemagglutinin Promotes T-Cell Response via Toll-Like Receptor 4-Mediated Dendritic Cells to Slow Tumor Progression in Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2014 Mar 12;349(2):279–87.
98. Chang J, Liu Y, Han B, Zhou C, Bai C, Li J. *Pseudomonas aeruginosa* preparation plus chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: a randomized, multicenter, double-blind phase III study. *Medical Oncology*. 2015 Mar 24;32(5).

99. Liu ZB, Hou YF, Zhu J, Hu DL, Jin W, Ou ZL, et al. Inhibition of EGFR pathway signaling and the metastatic potential of breast cancer cells by PA-MSHA mediated by type 1 fimbriae via a mannose-dependent manner. *Oncogene*. 2010 Mar 15;29(20):2996–3009.
100. Cheng X, Wang B, Jin Z, Ma D, Yang W, Zhao R, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-mannose-sensitive hemagglutinin inhibits pancreatic cancer cell proliferation and induces apoptosis via the EGFR pathway and caspase signaling. *Oncotarget*. 2016 Oct 24;7(47):77916–25.
101. Huang M, He F, Li D, Xie YJ, Jiang ZB, Huang JM, et al. PA-MSHA induces inflamed tumor microenvironment and sensitizes tumor to anti-PD-1 therapy. *Cell Death & Disease*. 2022 Nov 7;13(11).
102. Liu J, Duan X. PA-MSHA induces apoptosis and suppresses metastasis by tumor associated macrophages in bladder cancer cells. *Cancer Cell International*. 2017 Aug 17;17(1).
103. Li T, Dong Z, Guo Z, Wang C, Zhi X, Zhou J, et al. Mannose-mediated inhibitory effects of PA-MSHA on invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma via EGFR/Akt/IκBβ/NF-κB pathway. *Liver International*. 2014 Aug 21;35(4):1416–29.
104. Chang L, Xiao W, Yang Y, Li H, Xia D, Yu G, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-mannose-sensitive hemagglutinin inhibits epidermal growth factor receptor signaling pathway activation and induces apoptosis in bladder cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2014 Jan;32(1):36.e11-36.e18.
105. Fu X, Cui J, Meng X, Jiang P, Zheng Q, Zhao W, et al. Endoplasmic reticulum stress, cell death and tumor: Association between endoplasmic reticulum stress and the apoptosis pathway in tumors (Review). *Oncology Reports*. 2021 Jan 12;45(3):801–8.
106. Wang B, He Z, Yu H, Ou Z, Chen J, Yang M, et al. Intravesical *Pseudomonas aeruginosa* mannose-sensitive Hemagglutinin vaccine triggers a tumor-preventing immune environment in an orthotopic mouse bladder cancer model. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2021 Oct 31;71(6):1507–17.
107. Zheng X, Fang Y, Zou X, Wang X, Li Z. Therapeutic potential of *Pseudomonas aeruginosa*-mannose sensitive hemagglutinin (PA-MSHA) in cancer treatment. *Microbial Pathogenesis*. 2023 Dec;185(106422).
108. Li Z, Hao D, Li yun L, al. et. A clinical study on PA-MSHA vaccine in adjuvant therapy of lung cancer. *Chinese Journal of Lung Cancer*. 1999 Mar 15;2(1).
109. Li Z, Hao D, Zhang H, Ren L, Yang Y, Li L, et al. [A clinical study on PA-MSHA vaccine used for adjuvant therapy of lymphoma and lung cancer]. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2000;31(3):334–7.
110. Wei-Dong C, Zhong-Hua T, Feng X. [Application of PA-MSHA vaccine adjuvant therapy and TAC scheme for treatment of breast carcinoma]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2009;29(6):1204–7.
111. Lv F, Cao J, Liu Z, Wang Z, Zhang J, Zhang S, et al. Phase II Study of *Pseudomonas aeruginosa*-Mannose-Sensitive Hemagglutinin in Combination with Capecitabine for Her-2–Negative Metastatic Breast Cancer Pretreated with Anthracycline and Taxane. *PLOS ONE*. 2015 Mar 13;10(3):e0118607.
112. Zhang C, Zhang Z, Wang L, Han J, Li F, Shen C, et al. *Pseudomonas aeruginosa* - mannose sensitive hemagglutinin injection treated cytokine-induced killer cells combined with chemotherapy in the treatment of malignancies. *International Immunopharmacology*. 2017 Oct;51(1):57–65.
113. Zhou W, Duan Z, Yang B, Xiao C. The effective regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines induced by combination of PA-MSHA and BPIFB1 in initiation of innate immune responses. *Open Medicine*. 2017 Jan 1;12(1):299–307.
114. Marchant CA. Prediction of rodent carcinogenicity using the DEREK system for 30 chemicals currently being tested by the National Toxicology Program. The DEREK Collaborative Group. *Environmental Health Perspectives*. 1996 Oct;104(suppl 5):1065–73.

115. Greene N. Computer systems for the prediction of toxicity: an update. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002 Mar;54(3):417–31.
116. Greene N, Judson PN, Langowski JJ, Marchant CA. Knowledge-Based Expert Systems for Toxicity and Metabolism Prediction: DEREK, StAR and METEOR. *SAR and QSAR in Environmental Research*. 1999 Jul;10(2–3):299–314.
117. Davis AP, Murphy CG, Rosenstein MC, Wiegers TC, Mattingly CJ. The Comparative Toxicogenomics Database facilitates identification and understanding of chemical-gene-disease associations: arsenic as a case study. *BMC Medical Genomics*. 2008 Oct 9;1(1).
118. Davis AP, Grondin CJ, Johnson RJ, Sciaky D, McMorran R, Wiegers J, et al. The Comparative Toxicogenomics Database: update 2019. *Nucleic Acids Research*. 2018 Sep 24;47(D1):D948–54.
119. Davis AP, Murphy CG, Rosenstein MC, Wiegers TC, Mattingly CJ. The Comparative Toxicogenomics Database facilitates identification and understanding of chemical-gene-disease associations: arsenic as a case study. *BMC Medical Genomics*. 2008 Oct 9;1(1).
120. Davis AP, King BL, Mockus S, Murphy CG, Saraceni-Richards C, Rosenstein M, et al. The Comparative Toxicogenomics Database: update 2011. *Nucleic Acids Research*. 2010 Sep 22;39(Database):D1067–72.
121. Harris SM, Jin Y, Loch-Caruso R, Padilla IY, Meeker JD, Bakulski KM. Identification of environmental chemicals targeting miscarriage genes and pathways using the comparative toxicogenomics database. *Environmental Research*. 2020 May;184(109259).
122. Davis AP, Wiegers TC, Wiegers J, Wyatt B, Johnson RJ, Sciaky D, et al. CTD tetramers: a new online tool that computationally links curated chemicals, genes, phenotypes, and diseases to inform molecular mechanisms for environmental health. *Toxicological Sciences*. 2023 Jul 24;195(2):155–68.
123. Szklarczyk D, Santos A, von Mering C, Jensen LJ, Bork P, Kuhn M. STITCH 5: augmenting protein–chemical interaction networks with tissue and affinity data. *Nucleic Acids Research*. 2015 Nov 20;44(D1):D380–4.
124. Bozic D, Živančević K, Baralić K, Javorac D, Marić Đ, Buha Đorđević A, et al. Toxic potential of *Pseudomonas aeruginosa* mannose-sensitive hemagglutinin: *in silico* investigation of adverse outcomes in cancer patients. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*. 2022 Dec 31;68(03):371–2.
125. Cline MS, Smoot M, Cerami E, Kuchinsky A, Landys N, Workman C, et al. Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nature Protocols*. 2007 Sep 27;2(10):2366–82.
126. 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 Research*. 2003 Nov;13(11):2498–504.
127. Bindea G, Galon J, Mlecnik B. CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and *in silico* data. *Bioinformatics*. 2013 Jan 16;29(5):661–3.
128. Sherman BT, Hao M, Qiu J, Jiao X, Baseler MW, Lane HC, et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research*. 2022 Mar 23;50(W1):W216–21.
129. Dai W, Guo C, Wang Y, Li Y, Xie R, Wu J, et al. Identification of hub genes and pathways in lung metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2023 Apr 6;23(1).
130. Cossarizza A, Salvioli S. Flow Cytometric Analysis of Mitochondrial Membrane Potential Using JC-1. *Current Protocols in Cytometry*. 2000 Jul;13(1).
131. Haber LT, Dourson ML, Allen BC, Hertzberg RC, Parker A, Vincent MJ, et al. Benchmark dose (BMD) modeling: current practice, issues, and challenges. *Critical Reviews in Toxicology*. 2018 Mar 8;48(5):387–415.

132. Davis JA, Gift JS, Zhao QJ. Introduction to benchmark dose methods and U.S. EPA's benchmark dose software (BMDS) version 2.1.1. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2011 Jul;254(2):181–91.
133. More SJ, Bampidis V, Benford D, Bragard C, Halldorsson TI, Hernández-Jerez AF, et al. Guidance on the use of the benchmark dose approach in risk assessment. *EFSA Journal*. 2022 Oct;20(10).
134. 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 Journal*. 2017 Jan;15(1).
135. De Pretis F, Zhou Y, Xun P, Shao K. Benchmark dose modeling for epidemiological dose–response assessment using prospective cohort studies. *Risk Analysis*. 2023 Jul 27;1(1).
136. 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. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2018 Apr;54(1):87–94.
137. Howell SJ, Campone M, Cortés J, Duhoux FP, Ross S, Morris T, et al. Final results of the STEM trial: SFX-01 in the treatment and evaluation of ER+ Her2- metastatic breast cancer (mBC). *Annals of Oncology*. 2019 Oct;30(5):v122.
138. Galea I, Copple IM, Howat DW, Franklin S. SFX-01 reduces residual disability after experimental autoimmune encephalomyelitis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2019 May;30(1):257–61.
139. Baralić K, Buha Djordjevic A, Živančević K, Antonijević E, Anđelković M, Javorac D, et al. 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 23;17(3):746.
140. Javorac D, Baralić K, Marić Đ, Mandić-Rajčević S, Đukić-Ćosić D, Bulat Z, et al. Exploring the endocrine disrupting potential of lead through benchmark modelling – Study in humans. *Environmental Pollution*. 2023 Jan;316(1):120428.
141. He F, Ru X, Wen T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 Jul 6;21(13):4777.
142. Santín-Márquez R, Alarcón-Aguilar A, López-Diazguerrero NE, Chondrogianni N, Königsberg M. Sulforaphane - role in aging and neurodegeneration. *GeroScience*. 2019 Apr 2;41(5):655–70.
143. Kiser C, Gonul CP, Olcum M, Genc S. Inhibitory effects of sulforaphane on NLRP3 inflammasome activation. *Molecular Immunology*. 2021 Dec;140(1):175–85.
144. Fernandez-Prades L, Brasal-Prieto M, Alba G, Martin V, Montserrat-de la Paz S, Cejudo-Guillen M, et al. Sulforaphane Reduces the Chronic Inflammatory Immune Response of Human Dendritic Cells. *Nutrients*. 2023 Jul 31;15(15):3405.
145. Jia L, Wang C, Kong H, Yang J, Li F, Lv S, et al. Effect of PA-MSHA vaccine on plasma phospholipids metabolic profiling and the ratio of Th2/Th1 cells within immune organ of mouse IgA nephropathy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007 Jan;43(2):646–54.
146. Keyvanpour MR, Shirzad MB. An Analysis of QSAR Research Based on Machine Learning Concepts. *Current Drug Discovery Technologies*. 2021 Feb 10;18(1):17–30.
147. Maruyama T, Iizuka H, Tobisawa Y, Shiba T, Matsuda T, Kurohane K, et al. Influence of Local Treatments with Capsaicin or Allyl Isothiocyanate in the Sensitization Phase of a Fluorescein-Isothiocyanate-Induced Contact Sensitivity Model. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2007;143(2):144–54.
148. Matsuoka T, Endo Y, Kurohane K, Imai Y. Skin Sensitization to Fluorescein Isothiocyanate Is Enhanced by Butyl Paraben in a Mouse Model. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2018 Dec 1;41(12):1853–8.

149. Matsuda T, Maruyama T, Iizuka H, Kondo A, Tamai T, Kurohane K, et al. Phthalate esters reveal skin-sensitizing activity of phenethyl isothiocyanate in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2010 Jun;48(6):1704–8.
150. Ramzy AG, Hagvall L, Pei MN, Samuelsson K, Nilsson U. Investigation of diethylthiourea and ethyl isothiocyanate as potent skin allergens in chloroprene rubber. *Contact Dermatitis*. 2014 Dec 23;72(3):139–46.
151. Panwar H, Raghuram GV, Jain D, Ahirwar AK, Khan S, Jain SK, et al. Cell cycle deregulation by methyl isocyanate: Implications in liver carcinogenesis. *Environmental Toxicology*. 2012 Jan 5;29(3):284–97.
152. Zhang Q, Liu J, Duan H, Li R, Peng W, Wu C. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: An important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress. *Journal of Advanced Research*. 2021 Dec;34(1):43–63.
153. Li Y, Yang M, Xie L, Zhang G, Xu J, Xu S. Sulforaphane alleviates postresuscitation lung pyroptosis possibly via activating the nrf2/ho-1 pathway. *Shock*. 2023 Jul 12;60(3):427–33.
154. Li D, Shao R, Wang N, Zhou N, Du K, Shi J, et al. Sulforaphane Activates a lysosome-dependent transcriptional program to mitigate oxidative stress. *Autophagy*. 2020 Mar 15;17(4):872–87.
155. Ibrahim Fouad G. Sulforaphane, an Nrf-2 Agonist, Modulates Oxidative Stress and Inflammation in a Rat Model of Cuprizone-Induced Cardiotoxicity and Hepatotoxicity. *Cardiovascular Toxicology*. 2023 Jan;23(1):46–60.
156. Shang H, Shih Y, Lee C, Hsueh S, Liu J, Liao N, et al. Sulforaphane-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells through extrinsic and intrinsic signal pathways and altering associated genes expression assayed by cDNA microarray. *Environmental Toxicology*. 2016 Feb 2;32(1):311–28.
157. Moon SJ, Jhun J, Ryu J, Kwon J ye, Kim SY, Jung K, et al. The anti-arthritis effect of sulforaphane, an activator of Nrf2, is associated with inhibition of both B cell differentiation and the production of inflammatory cytokines. *PLOS ONE*. 2021 Feb 16;16(2):e0245986.
158. Lykouras D, Sampsonas F, Kaparianos A, Karkoulas K, Spiropoulos K. Role and Pharmacogenomics of TNF α in Asthma. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2008 Aug 1;8(9):934–42.
159. Furue K, Ito T, Tsuji G, Kadono T, Furue M. Psoriasis and the TNF/IL23/IL17 axis. *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia*. 2019 Jun;154(4).
160. Akash MSH, Rehman K, Liaqat A. Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2017 Jun 22;119(1):105–10.
161. Holbrook J, Lara-Reyna S, Jarosz-Griffiths H, McDermott MF. Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Research*. 2019 Jan 28;8(1):111.
162. Shen C, Zhang Z, Tian Y, Li F, Zhou L, Jiang W, et al. Sulforaphane enhances the antitumor response of chimeric antigen receptor T cells by regulating PD-1/PD-L1 pathway. *BMC Medicine*. 2021 Nov 25;19(1).
163. Thejass P, Kuttan G. Modulation of Cell-Mediated Immune Response in B16F-10 Melanoma-Induced Metastatic Tumor-Bearing C57BL/6 Mice by Sulforaphane. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2007 Jan;29(2):173–86.
164. Sawada Y, Saito-Sasaki N, Mashima E, Nakamura M. Daily Lifestyle and Inflammatory Skin Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 May 14;22(10):5204.
165. Liu T, Li S, Ying S, Tang S, Ding Y, Li Y, et al. The IL-23/IL-17 Pathway in Inflammatory Skin Diseases: From Bench to Bedside. *Frontiers in Immunology*. 2020 Nov 17;11(1).

166. Kim J, Kim BE, Leung DYM. Pathophysiology of atopic dermatitis: Clinical implications. *Allergy and Asthma Proceedings*. 2019 Mar 1;40(2):84–92.
167. Song G, Xu S, Zhang H, Wang Y, Xiao C, Jiang T, et al. TIMP1 is a prognostic marker for the progression and metastasis of colon cancer through FAK-PI3K/AKT and MAPK pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2016 Sep 20;35(1).
168. Hansson J, Lind L, Hulthe J, Sundstrom J. Relations of serum MMP-9 and TIMP-1 levels to left ventricular measures and cardiovascular risk factors: a population-based study. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*. 2009 Jun;16(3):297–303.
169. Cavusoglu E, Ruwende C, Chopra V, Yanamadala S, Eng C, Clark LT, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) is an independent predictor of all-cause mortality, cardiac mortality, and myocardial infarction. *American Heart Journal*. 2006 May;151(5):1101.e1-1101.e8.
170. Sundstrom J. Relations of plasma total TIMP-1 levels to cardiovascular risk factors and echocardiographic measures: the Framingham heart study. *European Heart Journal*. 2004 Sep;25(17):1509–16.
171. Goos JACM, Coupe VMH, Diosdado B, Delis-Van Diemen PM, Karga C, Beliën JAM, et al. Aurora kinase A (AURKA) expression in colorectal cancer liver metastasis is associated with poor prognosis. *British Journal of Cancer*. 2013 Oct;109(9):2445–52.
172. Chuang TP, Wang JY, Jao SW, Wu CC, Chen JH, Hsiao KH, et al. Over-expression of AURKA, SKA3 and DSN1 contributes to colorectal adenoma to carcinoma progression. *Oncotarget*. 2016 Jun 13;7(29):45803–18.
173. Jiang M, Bai M, Xu S, Wang T, Lei J, Xu M, et al. Blocking AURKA with MK-5108 attenuates renal fibrosis in chronic kidney disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2021 Nov;1867(11):166227.
174. Chen Y, Zhao X, Wu H. Transcriptional Programming in Arteriosclerotic Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2020 Oct 29;41(1):20–34.
175. Ukkat J, Hoang-Vu C, Trojanowicz B, Rebelo A. Osteocalcin, Osteopontin and RUNX2 Expression in Patients' Leucocytes with Arteriosclerosis. *Diseases*. 2021 Mar 12;9(1):19.
176. Jimenez-Preitner M, Berney X, Uldry M, Vitali A, Cinti S, Ledford JG, et al. Plac8 Is an Inducer of C/EBP β Required for Brown Fat Differentiation, Thermoregulation, and Control of Body Weight. *Cell Metabolism*. 2011 Nov;14(5):658–70.
177. Sasaki D, Kotoh J, Watadani R, Matsumoto K. New animal models reveal that coenzyme Q2 (Coq2) and placenta-specific 8 (Plac8) are candidate genes for the onset of type 2 diabetes associated with obesity in rats. *Mammalian Genome*. 2015 Aug 22;26(11–12):619–29.
178. Slade CD, Reagin KL, Lakshmanan HG, Klonowski KD, Watford WT. Placenta-specific 8 limits IFN γ production by CD4 T cells *in vitro* and promotes establishment of influenza-specific CD8 T cells *in vivo*. *PLOS ONE*. 2020 Jul 8;15(7):e0235706.
179. Ishiwata T, Cho K, Kawahara K, Yamamoto T, Fujiwara Y, Uchida E, et al. Role of lumican in cancer cells and adjacent stromal tissues in human pancreatic cancer. *Oncology Reports*. 2007 Sep 1;18(3):537–43.
180. dos Santos PW da S, Machado ART, De Grandis RA, Ribeiro DL, Tuttis K, Morselli M, et al. Transcriptome and DNA methylation changes modulated by sulforaphane induce cell cycle arrest, apoptosis, DNA damage, and suppression of proliferation in human liver cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2020 Feb;136(1):111047.
181. Huang X, Taeb S, Jahangiri S, Korpela E, Cadonic I, Yu N, et al. miR-620 promotes tumor radioresistance by targeting 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (HPGD). *Oncotarget*. 2015 Jun 4;6(26):22439–51.
182. Cho HY, Miller-DeGraff L, Blankenship-Paris T, Wang X, Bell DA, Lih F, et al. Sulforaphane enriched transcriptome of lung mitochondrial energy metabolism and provided

- pulmonary injury protection via Nrf2 in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2019 Feb;364(1):29–44.
183. Gery S, Sawyers CL, Agus DB, Said JW, Koeffler HP. TMEFF2 is an androgen-regulated gene exhibiting antiproliferative effects in prostate cancer cells. *Oncogene*. 2002 Jul 9;21(31):4739–46.
 184. Saraji A, Duan K, Watermann C, Hempel K, Roesch MC, Krupar R, et al. The Gene Expression Landscape of Prostate Cancer BM Reveals Close Interaction with the Bone Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Oct 27;23(21):13029.
 185. Kazemi M, Kouhpeikar H, Delbari Z, Khodadadi F, Gerayli S, Iranshahi M, et al. Combination of auraptene and arsenic trioxide induces apoptosis and cellular accumulation in the subG1 phase in adult T-cell leukemia cells. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2021 Jan 12;24(12):1643–9.
 186. Liu KC, Shih TY, Kuo CL, Ma YS, Yang JL, Wu PP, et al. Sulforaphane Induces Cell Death Through G2/M Phase Arrest and Triggers Apoptosis in HCT 116 Human Colon Cancer Cells. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2016 Jan;44(06):1289–310.
 187. Wang Y, Wu H, Dong N, Su X, Duan M, Wei Y, et al. Sulforaphane induces S-phase arrest and apoptosis via p53-dependent manner in gastric cancer cells. *Scientific Reports*. 2021 Jan 28;11(1).
 188. Habib TN, Altonsy MO, Ghanem SA, Salama MS, Hosny MA. Optimizing combination therapy in prostate cancer: mechanistic insights into the synergistic effects of Paclitaxel and Sulforaphane-induced apoptosis. *BMC Molecular and Cell Biology*. 2024 Mar 4;25(1).
 189. Rudolf E, Červinka M. Sulforaphane induces cytotoxicity and lysosome- and mitochondria-dependent cell death in colon cancer cells with deleted p53. *Toxicology in Vitro*. 2011 Oct;25(7):1302–9.
 190. Coppola S, Ghibelli L. GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptotic signalling. *Biochemical Society Transactions*. 2000 Feb 1;28(2):56–61.
 191. Kulikov AV, Shilov ES, Mufazalov IA, Gogvadze V, Nedospasov SA, Zhivotovsky B. Cytochrome c: the Achilles' heel in apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011 Dec 17;69(11):1787–97.
 192. Chimenti MS, Sunzini F, Fiorucci L, Botti E, Fonti GL, Conigliaro P, et al. Potential Role of Cytochrome c and Tryptase in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Pathogenesis: Focus on Resistance to Apoptosis and Oxidative Stress. *Frontiers in Immunology*. 2018 Oct 30;9(1).
 193. Sah DK, Arjunan A, Park SY, Lee B, Jung YD. Sulforaphane Inhibits IL-1 β -Induced IL-6 by Suppressing ROS Production, AP-1, and STAT3 in Colorectal Cancer HT-29 Cells. *Antioxidants*. 2024 Mar 28;13(4):406.
 194. Wang TH, Chen CC, Huang KY, Shih YM, Chen CY. High levels of EGFR prevent sulforaphane-induced reactive oxygen species-mediated apoptosis in non-small-cell lung cancer cells. *Phytomedicine*. 2019 Nov;64(1):152926.
 195. Subedi L, Lee JH, Yumnam S, Ji E, Kim SY. Anti-Inflammatory Effect of Sulforaphane on LPS-Activated Microglia Potentially through JNK/AP-1/NF- κ B Inhibition and Nrf2/HO-1 Activation. *Cells*. 2019 Feb 22;8(2):194.
 196. Santos PW, Machado ART, De Grandis R, Ribeiro DL, Tuttis K, Morselli M, et al. Effects of sulforaphane on the oxidative response, apoptosis, and the transcriptional profile of human stomach mucosa cells *in vitro*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2020 Jun;854–855(1):503201.
 197. Scholz S, Fischer S, Gündel U, Küster E, Luckenbach T, Voelker D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research*. 2008 Jun 25;15(5):394–404.

198. Eom YS, Shah FH, Kim SJ. Sulforaphane induces cell differentiation, melanogenesis and also inhibit the proliferation of melanoma cells. *European Journal of Pharmacology*. 2022 Apr;921(1):174894.
199. Rajesh V, Ilanthalir S. Cognition Enhancing Activity of Sulforaphane Against Scopolamine Induced Cognitive Impairment in Zebra Fish (*Danio rerio*). *Neurochemical Research*. 2016 Jun 2;41(10):2538–48.
200. Lu Y, Zhang Y, Lou Y, Cui W, Miao L. Sulforaphane suppresses obesity-related glomerulopathy-induced damage by enhancing autophagy via Nrf2. *Life Sciences*. 2020 Oct;258(1):118153.
201. Li J, Xie S, Teng W. Sulforaphane Attenuates Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Inhibiting Hepatic Steatosis and Apoptosis. *Nutrients*. 2021 Dec 24;14(1):76.
202. Katoch O, Kumar A, Adhikari JS, Dwarakanath BS, Agrawala PK. Sulforaphane mitigates genotoxicity induced by radiation and anticancer drugs in human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2013 Dec;758(1–2):29–34.
203. Leung AKC, Lam JM, Wong AHC, Hon KL, Li X. Iron Deficiency Anemia: An Updated Review. *Current Pediatric Reviews*. 2024 Aug;20(3):339–56.
204. Panda H, Keleku-Lukwete N, Kuga A, Fuke N, Suganuma H, Suzuki M, et al. Dietary supplementation with sulforaphane attenuates liver damage and heme overload in a sickle cell disease murine model. *Experimental Hematology*. 2019 Sep;77(1):51-60.e1.
205. Tian H, Xiong Y, Zhang Y, Leng Y, Tao J, Li L, et al. Activation of NRF2/FPN1 pathway attenuates myocardial ischemia–reperfusion injury in diabetic rats by regulating iron homeostasis and ferroptosis. *Cell Stress and Chaperones*. 2022 Mar;27(2):149–64.
206. Abassi P, Abassi F, Yari F, Hashemi M, Nafisi S. Study on the interaction of sulforaphane with human and bovine serum albumins. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2013 May;122(1):61–7.
207. Kumar A, Sabbioni G. New Biomarkers for Monitoring the Levels of Isothiocyanates in Humans. *Chemical Research in Toxicology*. 2010 Feb 4;23(4):756–65.
208. Zhao HD. Sulforaphane protects liver injury induced by intestinal ischemia reperfusion through Nrf2-ARE pathway. *World Journal of Gastroenterology*. 2010;16(24):3002.
209. Yang J, Guo X, Li T, Xie Y, Wang D, Yi L, et al. Sulforaphane Inhibits Exhaustive Exercise-Induced Liver Injury and Transcriptome-Based Mechanism Analysis. *Nutrients*. 2023 Jul 20;15(14):3220.
210. Rasha M, Huda A, May A, Maimoonah S, Khulud B, Noor A. Sulforaphane protects against LPS-induced liver injury in mice by antagonizing oxidative stress and apoptosis through AMPK activation. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2024 May 18;18(3):39–47.
211. Galanty A, Grudzińska M, Paździora W, Służały P, Paśko P. Do Brassica Vegetables Affect Thyroid Function?—A Comprehensive Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024 Apr 3;25(7):3988.
212. Sabatino L. Nrf2-Mediated Antioxidant Defense and Thyroid Hormone Signaling: A Focus on Cardioprotective Effects. *Antioxidants*. 2023 May 30;12(6):1177.
213. Renaud CO, Ziros PG, Chartoumpekis DV, Bongiovanni M, Sykiotis GP. Keap1/Nrf2 Signaling: A New Player in Thyroid Pathophysiology and Thyroid Cancer. *Frontiers in Endocrinology*. 2019 Aug 2;10(1).
214. Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016 Apr 21;73(17):3221–47.
215. Liu S, Pi J, Zhang Q. Signal amplification in the KEAP1-NRF2-ARE antioxidant response pathway. *Redox Biology*. 2022 Aug;54(1):102389.

216. Adelusi TI, Du L, Hao M, Zhou X, Xuan Q, Apu C, et al. Keap1/Nrf2/ARE signaling unfolds therapeutic targets for redox imbalanced-mediated diseases and diabetic nephropathy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020 Mar;123(1):109732.
217. Tu W, Wang H, Li S, Liu Q, Sha H. The Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE Signaling Pathway in Chronic Diseases. *Aging and disease*. 2019;10(3):637.
218. Michaličková D, Hrnčír T, Canová NK, Slanař O. Targeting Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway in multiple sclerosis. *European Journal of Pharmacology*. 2020 Apr;873(1):172973.
219. Wang Q, Botchway BOA, Zhang Y, Liu X. Ellagic acid activates the Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway in improving Parkinson's disease: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022 Dec;156(1):113848.
220. Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, et al. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nature Communications*. 2016 May 23;7(1).
221. Guo WJ, Qi H, Deng CY, Zhou HX, Deng SP, Li FR. The roles of IL-2 and IL-10 enhance anti-CD45RBmAb immune inhibition in allograft skin. *Immunologic Research*. 2014 Dec 31;61(3):250–9.
222. Jiang Q, Yang G, Liu Q, Wang S, Cui D. Function and Role of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in Immunology*. 2021 Apr 1;12(1).
223. Abouzed TK, Beltagy ER, Kahilo KA, Ibrahim WM. Molecular changes associated with the anticancer effect of sulforaphane against Ehrlich solid tumour in mice. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2020 Oct 23;35(2).
224. Wu S, Gao Q, Zhao P, Gao Y, Xi Y, Wang X, et al. Sulforaphane produces antidepressant- and anxiolytic-like effects in adult mice. *Behavioural Brain Research*. 2016 Mar;301(1):55–62.
225. Nakatake R, Okuyama T, Hashimoto Y, Ishizaki M, Yanagida H, Kitade H, et al. Sulforaphane Is Protective against Warm Ischemia/Reperfusion Injury and Partial Hepatectomy in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024 Jan 1;25(1):579.
226. Noh JR, Kim YH, Hwang JH, Choi DH, Kim KS, Oh WK, et al. Sulforaphane protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*. 2015 Jun;80(1):193–200.
227. Chen L, Zhang WL, Xie D qiong, Jia W. Sulforaphane alleviates hepatic ischemia–reperfusion injury through promoting the activation of Nrf-2/HO-1 signaling. *Transplant Immunology*. 2021 Oct;68(1):101439.
228. Pan J, Wang R, Pei Y, Wang D, Wu N, Ji Y, et al. Sulforaphane alleviated vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension via inhibiting inflammation and oxidative stress. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2023 Jan;111(1):109182.
229. Wang AS, Xu Y, Zhang ZW, Lu BB, Yin X, Yao AJ, et al. Sulforaphane protects MLE-12 lung epithelial cells against oxidative damage caused by ambient air particulate matter. *Food & Function*. 2017;8(12):4555–62.
230. Monteiro EB, Ajackson M, Stockler-Pinto MB, Guebre-Egziabher F, Daleprane JB, Soulage CO. Sulforaphane exhibits potent renoprotective effects in preclinical models of kidney diseases: A systematic review and meta-analysis. *Life Sciences*. 2023 Jun;322(1):121664.
231. Yoon HY, Kang NI, Lee HK, Jang KY, Park JW, Park BH. Sulforaphane protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through induction of the Nrf2-dependent phase 2 enzyme. *Biochemical Pharmacology*. 2008 Jun;75(11):2214–23.
232. Sharma L, Wu W, Dholakiya SL, Gorasiya S, Wu J, Sitapara R, et al. Assessment of Phagocytic Activity of Cultured Macrophages Using Fluorescence Microscopy and Flow Cytometry. In: *Cytokine Bioassays* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2014 [cited 2024 May 27]. p. 137–45. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-0928-5_12

233. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013 Dec 20;15(1):49–63.
234. Zhang Y, Kong R, Yang W, Hu K, Zhao Z, Li L, et al. DUSP2 recruits CSNK2A1 to suppress AKT1-mediated apoptosis resistance under hypoxic microenvironment in pancreatic cancer. *Cancer Letters*. 2023 Aug;568(1):216288.
235. Eskandari E, Eaves CJ. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *Journal of Cell Biology*. 2022 May 12;221(6).
236. Sinha RA, Singh BK, Yen PM. Direct effects of thyroid hormones on hepatic lipid metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*. 2018 Feb 23;14(5):259–69.
237. Wu Z, Jiang Y, Li P, Wang Y, Zhang H, Li Z, et al. Association of impaired sensitivity to thyroid hormones with hyperuricemia through obesity in the euthyroid population. *Journal of Translational Medicine*. 2023 Jul 5;21(1).
238. Kelly DM, Jones TH. Testosterone and obesity. *Obesity Reviews*. 2015 May 15;16(7):581–606.
239. Wittert G, Grossmann M. Obesity, type 2 diabetes, and testosterone in ageing men. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2022 Jul 14;23(6):1233–42.
240. Sheng X, Chen W, Xu Y, Lin F, Cao H. Higher Mean Corpuscular hemoglobin Concentration is Associated with Worse Prognosis of Hepatorenal Syndrome: A Multicenter Retrospective Study. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2022 Jan;363(1):25–32.
241. Ahmed SS, Mohammed AA. Effects of thyroid dysfunction on hematological parameters: Case controlled study. *Annals of Medicine and Surgery*. 2020 Sep;57(1):52–5.
242. Dorgalaleh A, Mahmoodi M, Varmaghani B, Kiani Node F, Saeedi Kia O, Alizadeh S, et al. Effect of thyroid dysfunctions on blood cell count and red blood cell indice. *Iranian Journal of Pediatric Hematology & Oncology*. 2013 Apr 22;3(2):73–7.
243. von Tempelhoff GF, Schelkunov O, Demirhan A, Tsikouras P, Rath W, Velten E, et al. Correlation between blood rheological properties and red blood cell indices(MCH, MCV, MCHC) in healthy women. *Clinical hemiorheology and Microcirculation*. 2016 Feb 16;62(1):45–54.
244. Iype J, Fux M. Basophils Orchestrating Eosinophils' Chemiotaxis and Function in Allergic Inflammation. *Cells*. 2021 Apr 14;10(4):895.
245. Zhang W, Sun J, Shen X, Xue Y, Yuan S, Wang X. Effect of PA-MSAH preprocessing on the expression of TLR-4-NF-κB pathway and inflammatory factors in the intestinal tract of rats with septic shock. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2019 Feb 6;4(1):2567–74.
246. Yang W, Tao Y, Wu Y, Zhao X, Ye W, Zhao D, et al. Neutrophils promote the development of reparative macrophages mediated by ROS to orchestrate liver repair. *Nature Communications*. 2019 Mar 6;10(1).
247. Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, Scolaro T, Castegna A. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Frontiers in Immunology*. 2019 Jul 3;10(1).
248. Lepletier A, Alsharif A, Chidgey AP. Inflammation and Thymus Ageing. In: *Endocrine Immunology* [Internet]. S. Karger AG; 2017 [cited 2024 May 31]. p. 19–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1159/000452903>
249. Green R, Datta Mitra A. Megaloblastic Anemias. *Medical Clinics of North America*. 2017 Mar;101(2):297–317.
250. Naber T, Purohit S. Chronic Kidney Disease: Role of Diet for a Reduction in the Severity of the Disease. *Nutrients*. 2021 Sep 19;13(9):3277.
251. Wang L, Lou W, Zhang Y, Chen Z, Huang Y, Jin H. HO-1–Mediated Autophagic Restoration Protects Lens Epithelial Cells Against Oxidative Stress and Cellular Senescence. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2023 Dec 5;64(15):6.

252. Liu FC, Tsai YF, Tsai HI, Yu HP. Anti-Inflammatory and Organ-Protective Effects of Resveratrol in Trauma-Hemorrhagic Injury. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015:643763.
253. Dennis JM, Witting PK. Protective Role for Antioxidants in Acute Kidney Disease. *Nutrients.* 2017 Jul 7;9(7):718.
254. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2016 Oct;16(10):626-38.
255. Desert R, Chen W, Ge X, Viel R, Han H, Athavale D, Das S, Song Z, Lantvit D, Cano L, Naba A, Musso O, Nieto N. Hepatocellular carcinomas, exhibiting intratumor fibrosis, express cancer-specific extracellular matrix remodeling and WNT/TGFB signatures, associated with poor outcome. *Hepatology.* 2023 Sep 1;78(3):741-757.
256. Stürken C, Möbus V, Milde-Langosch K, Schmatloch S, Fasching PA, Rüschoff J, et al. TGFB-induced factor homeobox 1 (TGIF) expression in breast cancer. *BMC Cancer.* 2021 Aug 14;21(1):920.
257. Kwon HY, Yoon Y, Hong JE, Rhee KJ, Sohn JH, Jung PY, Kim MY, Baik SK, Ryu H, Eom YW. Role of TGF- β and p38 MAPK in TSG-6 Expression in Adipose Tissue-Derived Stem Cells In Vitro and In Vivo. *Int J Mol Sci.* 2023 Dec 29;25(1):477.
258. Yang X, Mo W, Shi Y, Fang X, Xu Y, He X, Xu Y. Fumaria officinalis-loaded chitosan nanoparticles dispersed in an alginate hydrogel promote diabetic wounds healing by upregulating VEGF, TGF- β , and b-FGF genes: A preclinical investigation. *Heliyon.* 2023 Jun 29;9(7):e17704.
259. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, Zhang Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomark Res.* 2020 Sep 29;8:49.
260. Uddbäck I, Michalets SE, Saha A, Mattingly C, Kost KN, Williams ME, et al. Prevention of respiratory virus transmission by resident memory CD8⁺ T cells. *Nature.* 2024 Feb;626(7998):392-400.
261. Langer V, Vivi E, Regensburger D, Winkler TH, Waldner MJ, Rath T, et al. IFN- γ drives inflammatory bowel disease pathogenesis through VE-cadherin-directed vascular barrier disruption. *J Clin Invest.* 2019 Nov 1;129(11):4691-4707.

8. PRILOZI

8.1. Prilog 1 - Dodatni rezultati

(A)

Derek Nexus Prediction Report

Alert Descriptions

Alert: 304 Isocyanate or isothiocyanate (from KB: Derek KB 2020 1.0)

Alert Description Image	Match with query compound
$\text{R1}-\text{N}=\text{C}=\text{R2}$ $\text{R1} = \text{C}$ $\text{R2} = \text{O}, \text{S}$	

(B)

Predictions

Knowledge Base: Derek KB 2020 1.0

Version	Last Modified Date	Certified by
1.0	26/03/2020 09:28:54	Lhasa Limited, Leeds, Yorkshire, UK

Reasoning Summary

- ◆ **Chromosome damage in vitro in mammal is PLAUSIBLE**
 - Alert matched: 304 Isocyanate or isothiocyanate
- ◆ **Mutagenicity in vitro in bacterium is PLAUSIBLE**
 - Alert matched: 304 Isocyanate or isothiocyanate
- ◆ **Skin sensitisation in mammal is PLAUSIBLE**
 - Alert matched: 410 Isothiocyanate

Slika 1. Toksofore u molekulu sulforafana (Derek Nexus) (A), predviđeni toksični efekti sulforafana sa nivoom dokaza (B)

Tabela 1. Sulforafan-intereagujući geni čija je ekspresija povećana, odnosno smanjena u kolorektalnom karcinomu, karcinomu pankresa i prostate

	Povećano eksprimirani geni	Smanjeno eksprimirani geni
Kolorektalni karcinom	GPM6B, AKR1B10, FHL1, SYNM, CNN1, PCK1, BCHE, CFD, HPGD, SLC26A2, MMP28, PDE9A, PLN, CLU, TMEM100, FABP4, DHRS11, GCNT3, PLAC8, TCF21, OGN, PLCE1, KLF4, MT1E, SFRP1, SGK1, EPHA7, CPM, BMP2, MT1G, KIT, NR5A2, ALDH1A1, TSPAN1, RCAN2, KLF9, SELENBP1, PPARGC1A, MLIP, SORBS2, MFAP4, TOX, ANK2, FGL2, BEX4, CKB, ADGRL3, CRYAB, ENTPD5, GSN, HSPA2, EPHX2, UGDH, F13A1, FBLN1, ETFDH, PLPP1, PEG10, PIGR, DSC2, PTX3, CES3, ABHD3, COL4A5, GALNT12, BRINP3	CDK1, TRIP13, SLC7A11, AURKA, BUB1, ENC1, UBE2S, EGFL6, PLAUI, CEP55, NEK2, NOX4, SOX4, COL1A1, SCD, LRP8, CKS2, EDNRA, TIMP1, SOX9, NEBL, DUSP4, CXCL2, TRIM29, CCL20, PMEPA1, MFAP2, CXCL1, TACSTD2, TRIB3, CXCL8, SPP1, SLC6A6
Karcinom pankreasa	LUM, LAMA3, HPGD, HKCD1, FBXO32, F13A1, COL5A1, ACTA2	NPC1, CFTR, DUSP4, HSPD1
Karcinom prostate	BEX4, CKB, ADGRL3, CRYAB, ERG, ABCC4, ARFGEF3, ENTPD5, SPON2, TMEFF2	PLN, DES, GSTM3, ACTG2, CNN1, MAMDC2, MYLK, NOX4, PGM5, PPP1R3C, SYNM

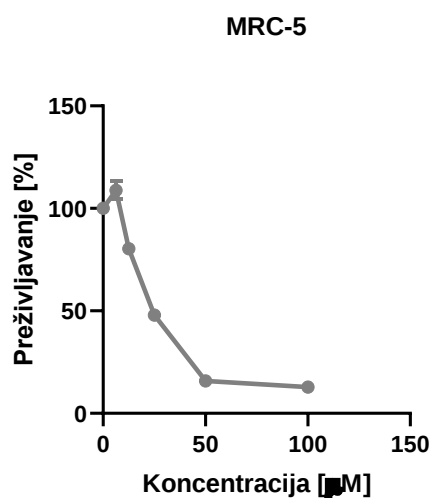
Tabela 2. Inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*-intereagujući geni preuzeti iz dostupnih literaturnih podataka

	Povećano eksprimirani geni	Smanjeno eksprimirani geni
Inaktivisana bakterija <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATG5, TLR6, TLR7, TICAM1, LAMP1, CD80, IL4, TLR3, AKT3, IL5, CD28, BAD, TLR1, CD40LG, TLR9, CSF3, IL10, MAPK10, CD86, ITGAX, IFNG, TLR2, TLR4, CXCL10, CCL2, ARG1, CD40, CCL21, CXCL12, BAX, CD14, MAPK9, IL6, AKT2, MAPK8, CDKN1B, NFKB2, CASP8, TNF, MYD88, PTEN, CDKN1A, CASP3, MAPK3, MAPK1, CDH1, MAPK14	EGFR, AKT, ERK, MMP9, VEGF, CCND1, CCNE1, CDK2, CDK4, PCNA, VIM, SNAI1, NRF2, SKSTM1, NOS2, BCL2, GSK3B, CTLA4, PDCD1

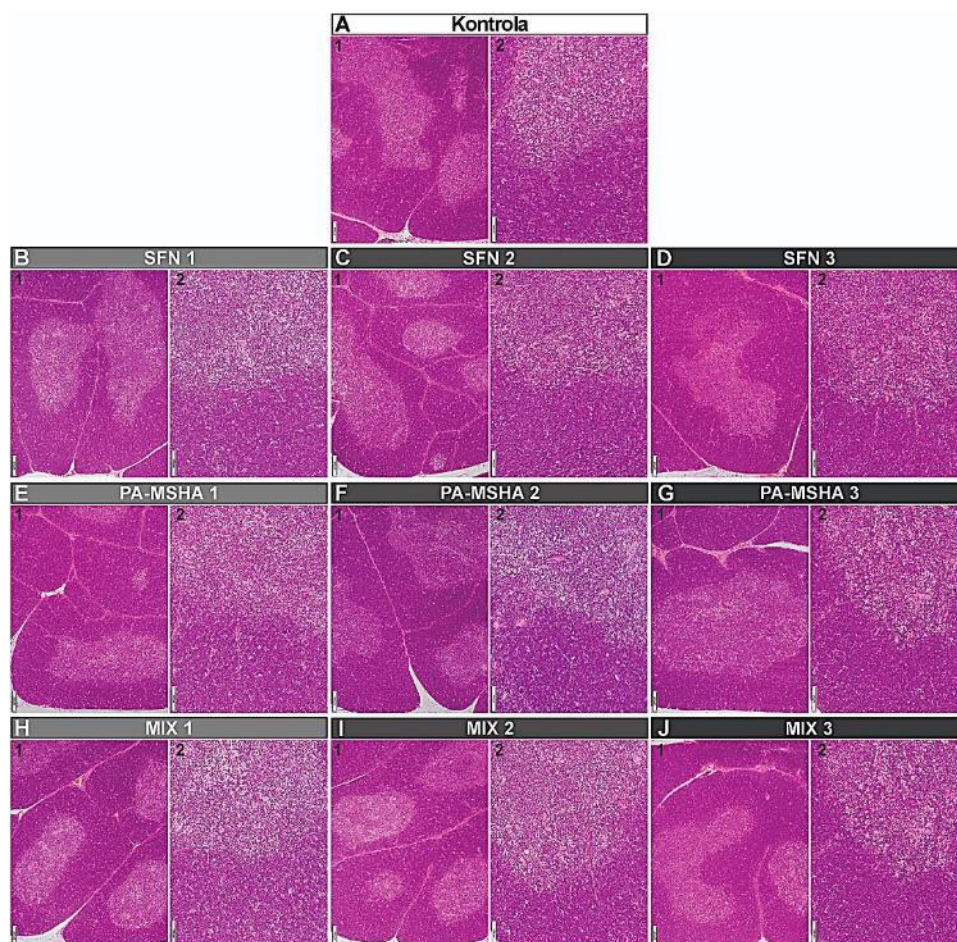
Tabela 3. Vrsta interakcija između ispitivanih imunomodulatora i zajedničkih gena (CTD; <https://ctdbase.org/>) i metabolički proces regulisan datim genima

Gen	PA-MSHA	SFN	Metabolički proces
<i>AKT1</i>	↑	↓↑	Apoptoza
<i>BAD</i>	↑	↓	Apoptoza
<i>BAX</i>	↑	↑	Apoptoza
<i>CASP3</i>	↑	↑	Apoptoza
<i>CASP8</i>	↑	↑	Apoptoza
<i>CCL2</i>	↑	↓↑	Imunski odgovor
<i>CD14</i>	↑	↑	Imunski odgovor
<i>CDH1</i>	↑	↓↑	Imunski odgovor
<i>CDKN1A</i>	↑	↑	Imunski odgovor
<i>IFNG</i>	↑	↓	Imunski odgovor
<i>TLR4</i>	↑	↑	Imunski odgovor
<i>TLR6</i>	↑	↑	Imunski odgovor
<i>TNF</i>	↑	↓↑	Imunski odgovor

SFN: sulforafan, PA-MSHA: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

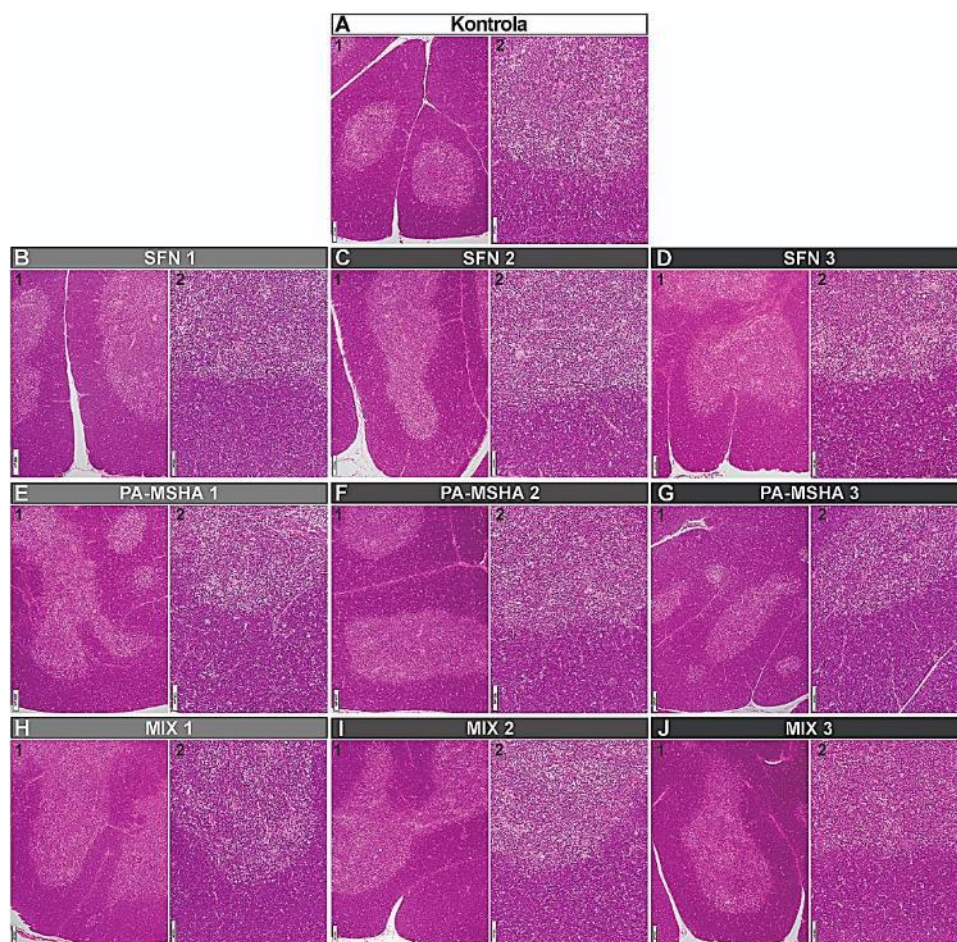


Slika 2. Kriva preživljavanja MRC-5 ćelija nakon tretmana rastućim koncentracijama sulforafana tokom 72 sata



Slika 3. Reprezentativne fotomikrografije preseka timusa mužjaka pacova iz kontrolne grupe (A1, A2) i tretiranih grupa SFN1 (B1, B2), SFN2 (C1, C2), SFN3 (D1, D2), PA-MSHA1 (E1, E2), PA-MSHA2 (F1, F2), PA-MSHA3 (G1, G2), MIKS1 (H1, H2), MIKS2 (I1, I2) i MIKS3 (J1, J2). Preseci tkiva obojeni hematoksilinom/eozinom i posmatrani pomoću objektiva 4x (A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1, I1, J1) (bar: 200 μ m) i objektiva 10x (A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2, H2, I2, J2) (bar: 100 μ m)

SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m./dan), SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m./dan), SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m./dan); PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + $0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + $0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + $0,36 \times 10^9$ ćelija/ml)



Slika 4. Reprezentativne fotomikrografije preseka timusa ženki pacova iz kontrolne grupe (A1, A2) i tretiranih grupa SFN1 (B1, B2), SFN2 (C1, C2), SFN3 (D1, D2), PA-MSHA1 (E1, E2), PA-MSHA2 (F1, F2), PA-MSHA3 (G1, G2), MIKS1 (H1, H2), MIKS2 (I1, I2) i MIKS3 (J1, J2). Preseci tkiva obojeni hematoksilinom/eozinom i posmatrani pomoću objektiva 4x (A1, B1, C1, D1, E1, F1 G1, H1, I1, J1) (bar: 200 μ m) i objektiva 10x (A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2, H2, I2, J2) (bar: 100 μ m)

SFN 1: sulforafan (0,5 mg/kg t.m./dan), SFN 2: sulforafan (2 mg/kg t.m./dan), SFN 3: sulforafan (5 mg/kg t.m./dan); PA-MSHA 1: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 2: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); PA-MSHA 3: inaktivisana bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ($0,36 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 1: SFN + PA-MSHA (0,5 mg/kg t.m./dan + $0,09 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 2: SFN + PA-MSHA (2 mg/kg t.m./dan + $0,18 \times 10^9$ ćelija/ml); MIX 3: SFN + PA-MSHA (5 mg/kg t.m./dan + $0,36 \times 10^9$ ćelija/ml)

8.2. Prilog 2 - Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije

Rad u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a)

Bozic D, Baralić K, Živančević K, Antonijević Miljaković E, Ćurčić M, Antonijević B, Buha Djordjević A, Bulat Z, Zhang Y, Yang L, Đukić-Ćosić D. Predicting sulforaphane-induced adverse effects in colon cancer patients via *in silico* investigation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022 Feb 1;146:112598.

Bozic D, Živančević K, Baralić K, Antonijević Miljaković E, Buha Djordjević A, Ćurčić M, Bulat Z, Đukić-Ćosić D. Conducting bioinformatics analysis to predict sulforaphane-triggered adverse outcome pathways in healthy human cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023;160:114316.

Baralić K, Živanović J, Marić Đ, **Bozic D**, Grahovac L, Antonijević Miljaković E, Ćurčić M, Buha Djordjević A, Bulat Z, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Sulforaphane – a compound with potential health benefits in disease prevention and treatment: insights from pharmacological and toxicological experimental studies. *Antioxidants*. 2023;13:147.

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21)

Bozic D, Živanović J, Živančević K, Baralić K, Đukić-Ćosić D. Current trends in anti-tumor effects of *Pseudomonas aeruginosa* mannose-sensitive-hemagglutinin (PA-MSHA): an overview of positive and negative effects. *Cancers*. 2024;16:524.

Predavanje po pozivu sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M32)

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

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celosti (M33)

Božić D, Živančević K, Baralić K, Javorac D, Buha Đorđević A, Antonijević Miljaković E, Marić Đ, Ćurčić M, Bulat Z, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Applying „*in silico*“ toxicogenomic data mining to predict molecular mechanisms and pathways against carcinoma: immunomodulator sulforaphane as a case study. 1st International Conference on Chemo and BioInformatics, ICCBIKG 2021, (470-473). DOI: 10.46793/ICCB121.470B

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34)

Đukić-Ćosić D, Baralić K, Živančević K, Buha Đorđević A, Antonijević Miljaković E, Ćurčić M, Javorac D, Marić Đ, Bulat Z, Antonijević B, **Jorgovanović D**. Investigating the sulforaphane safety: *in silico* toxicogenomic data mining approach. Abstracts of the 6th Croatian Congress of Toxicology with International Participation, CROTOX 2021, Rabac, Croatia, 3-6 October 2021.

Bozic D, Živančević K, Baralić K, Tavrić J, Plankoš A, Ćurčić M, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Mechanistic studies of sulforaphane induced toxicity: *in silico* approach. Toxicology Letters Official Journal of EUROTOX, Abstracts of the Toxicology Letters Official Journal of EUROTOX, Abstracts of the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX) Maastricht, the Netherlands, September 18–21, 2022. Toxicol Lett, 368S1 (2022), p87.

Živanović J, Šljivić J, **Božić D**, Baralić K, Živančević K, Marić Đ, Antonijević Miljković E, Buha Đorđević A, Ćurčić M, Bulat Z, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Predicting sulforaphane-induced adverse effects in prostatic cancer patients via *in silico* investigation. Abstracts of the 57th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX); 2023 September 10-13; Ljubljana, Slovenia: Elsevier; 2023. 114p. (Toxicology Letter; vol. 384S1).

Bozic D, Baralić K, Živanović J, Živančević K, Đukić-Ćosić D. Comparative study of positive and negative sulforaphane activity against different tumor types via bioinformatic analysis. Abstracts of the 57th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX); 2023 September 10-13; Ljubljana, Slovenia: Elsevier; 2023. 115p. (Toxicology Letter; vol. 384S1).

Božić D, Baralić K, Živanović J, Živančević K, Marić Đ, Vukelić D, Manić L, Grahovac L, Ćurčić M, Antonijević Miljković E, Buha Djordjevic A, Bulat Z, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Sulforaphane and sulforaphane - glucosinolate toxicity prediction using the *in silico* US-EPA comptox chemicals dashboard method. 13th International Congress of the Serbian Society of toxicology; 2023 May 10-12; Serbian Society of toxicology, Belgrade, Serbia: Book of Abstracts; 155-156p.

Đurić A, Srdić-Rajić T, **Božić D**, Baralić K, Pavić A, Đukić-Ćosić D. Sulforaphane affects morphological changes and cell viability of colon cancer cells: p53 mutation-dependent effect. 13th International Congress of the Serbian Society of toxicology; 2023 May 10-12; Serbian Society of toxicology, Belgrade, Serbia: Book of Abstracts; 179-180p.

Pavić A, Radaković N, Srdić-Rajić T, **Božić D**, Baralić K, Đukić-Ćosić D. Toxicity testing of D,L-sulforaphane in a zebrafish model. 13th International Congress of the Serbian Society of toxicology; 2023 May 10-12; Serbian Society of toxicology, Belgrade, Serbia: Book of Abstracts; 253-254p.

Bozic D, Baralić K, Živančević K, Marić Đ, Vukelić D, Živanović J, Manić L, Grahovac L, Pavić A, Radaković N, Antonijević Miljković E, Buha Djordjevic A, Ćurčić M, Bulat Z, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Improving anti-cancer immunotherapy efficacy by combining immune modulators. 13th International Congress of the Serbian Society of toxicology; 2023 May 10-12; Serbian Society of toxicology, Belgrade, Serbia: Book of Abstracts; 290-291p.

Živanović J, Baralić K, **Božić D**, Živančević K, Marić Đ, Antonijević Miljković E, Buha Djordjevic A, Ćurčić M, Bulat Z, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Sulforaphane's link with obesity: insights from *in silico* analysis on key genes, pathways and gene ontology. XII Congress of Toxicology in Developing Countries, 2024 April 15-18; Sanitjago, Čile.

Živanović J, Baralić K, **Božić D**, Pavić A, Živančević K, Marić Đ, Antonijević Miljković E, Buha Djordjevic A, Ćurčić M, Bulat Z, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Applying a dual-method approach to test sulforaphane's hepatotoxicity: zebrafish embryo and *in silico*

investigation. XII Congres of Toxicology in Developing Countries, 2024 April 15-18; Sanitijago, Čile.

Božić D, Pavić A, Baralić K, Živanović J, Živančević K, Đukić-Ćosić D. Applying benchmark approach to assess the safety of D,L-sulforaphane in zebrafish embryos. XII Congres of Toxicology in Developing Countries, 2024 April 15-18; Sanitijago, Čile.

Baralić K, Marić Đ, **Božić D**, Živanović J, Antonijević Miljaković E, Buha Djordjevic A, Ćurčić M, Bulat Z, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Gender-specific effects of 7-day orally administered D,L-sulforaphane on bodyweight and food consumption in rats. XII Congres of Toxicology in Developing Countries, 2024 April 15-18; Sanitijago, Čile.

Baralić K, **Božić D**, Marić Đ, Živanović J, Živančević K, Antonijević Miljaković E, Buha Djordjevic A, Ćurčić M, Bulat Z, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Exploring thyroid effects and gender - specific responses to *Pseudomonas aeruginosa* mannose-sensitive hemagglutinin (PA-MSHA): a rat model study. ECE 2024, 26th European Confress of Endocrinology, 11-14 May 2024, Stokholm, Švedska.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u celini (M63)

Bozic D, Živančević K, Baralić K, Javorac D, Marić Đ, Buha Đorđević A, Bulat Z, Đukić-Ćosić D. Toxic potential of *Pseudomonas aeruginosa* mannose-sensitive hemagglutinin: *in Silico* investigation of adverse outcomes in cancer patients. Macedonian Pharmaceutical Bulletin, 68 (Suppl 1): 371 – 372 p.

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

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)

Živančević K, Baralić K, **Božić D**, Javorac D, Marić Đ, Antonijević Miljaković E, Buha Đorđević A, Ćurčić M, Bulat Z, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Predviđanje štetnih efekata sulforafana in silico ispitivanjem njegovog ciljanog dejstva na gene, protein-protein interakcije i klase molekula. VIII Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, 12-15 oktobar 2022. Arhiv za farmaciju, 4S: p592

Božić D, Baralić K, Živančević K, Đukić-Ćosić D. Toksični potencijal kombinovane primene sulforafana i pseudomonas aeruginosa - hemagglutinin osetljiv na manozu kod pacijenata obolelih od raka. VIII Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, 12-15 oktobar 2022. Arhiv za farmaciju, 4S: p60

9. BIOGRAFIJA AUTORA

Dragica Božić (rođ. Jorgovanović) rođena je 09.12.1992. godine u Boru, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju kao nosilac diplome „Vuk Karadžić”. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, studijski program Farmacija, upisala je školske 2011/12. godine. Tokom studija bila je stipendista Ministarstva prosvete Republike Srbije, školske 2011/2012. godine. U toku integrisanih akademskih studija učestvovala je u izradi studentskog naučno-istraživačkog rada pod nazivom „Uticaj navika u ishrani na unos žive kod trudnica u Beogradu”. Diplomirala je 22.09.2016. godine sa prosečnom ocenom 8,71. Završni rad pod nazivom „Toksičnost antiretroviralnih lekova” odbranila je na Katedri za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović” sa ocenom 10. Po obavljenom pripravnničkom stažu za farmaceute u Apoteci „Sana” i Opštoj bolnici u Boru položila je stručni ispit 05.07.2017. godine. Doktorske akademske studije na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu, modul Toksikologija, upisala je akademske 2016/17. godine i položila sve ispite predviđene planom i programom doktorskih akademskih studija. U periodu od septembra 2018. do aprila 2019. godine boravila je u Narodnoj Republici Kini kao gostujući student kod profesora Yi Zhang-a, u biomedicinskom centru Prve pridružene bolnice Džengdžou Univerziteta, provincija Henan (The First Affiliated Hospital of Zhengzhou Univeristy, Zhengzhou, Henan, China). U zvanje istraživač-pripravnik izabrana je 21. novembra 2019. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a istraživač - saradnik 20. oktobra 2022. godine. Od sredine 2021. godine je angažovana na istraživačko-razvojnom projektu u okviru međunarodne saradnje između Republike Srbije i Narodne Republike Kine pod nazivom „Povećanje efikasnosti imunoterapije karcinoma kombinacijom CAR-T ćelija ili PD-1/PD-L1 inhibitora sa imunomodulatorima”, a čiji je nosilac Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu. Takođe, od aprila 2021. do novembra 2021. godine učestvovala je na projektu „Informisana mama, zdrava beba – kako bezbedno živeti sa hemikalijama?” čiji je nosilac Udruženje toksikologa Srbije, a finansiran je od strane Ministarstva zdravlja Republike Srbije. Od 2022. do 2024. učestvuje u realizaciji projekta „Upoznaj toksičnost – živi bezbedno (MeeTox)” čiji je nosilac Udruženje toksikologa Srbije, Srbija. Dobitnik je nagrade za najbolje rezultate naučnoistraživačkog rada nastavnika i saradnika Farmaceutskog fakulteta u Beogradu za 2020/2021. školsku godinu, „Veselin Lučić”, kao i druge godišnje nagrade Farmaceutskog fakulteta u Beogradu za najbolje naučno - istraživačke radove studenata posle diplomskih studija u 2023. godini. 2018. godine položila je TOEFL (Test of English as a Foreign Language) ispit sa ukupnim skorom 93 što odgovara višem srednjem nivou engleskog jezika koji na skali Zajedničkog okvira Saveta Evrope nosi oznaku B2. Član je Saveza farmaceutskih udruženja Srbije, Udruženja toksikologa Srbije, Evropskog udruženja toksikologa - EUROTOX i Međunarodnog udruženja toksikologa - IUTOX.

10. IZJAVE AUTORA DOKTORSKE DISERTACIJE

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Драгица Божић

Број индекса 11/2016

Изјављујем

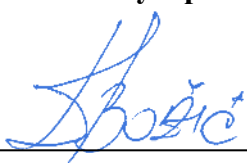
да је докторска дисертација под насловом

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

- 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, 04.07.2024



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Драгица Божић

Број индекса 11/2016

Студијски програм Токсикологија

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

Ментори др сц. Данијела Ђукић-Ћосић, редовни професор и др сц. Александар
Павић, научни саветник

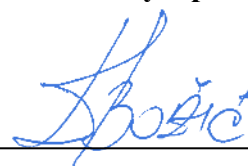
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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, 04.07.2024



Изјава о коришћењу

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

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

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).

У Београду, 04.07.2024

Потпис аутора



1. **Ауторство.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.

