



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ  
НАУКА

Радомир Шћепановић

**Утицај антиоксидантне суплементације  
екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на  
манифестације системске токсичности  
наночестица калцијумфосфата код  
пацова**

докторска дисертација

Крагујевац, 2021.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU  
FAKULTET MEDICINSKIH  
NAUKA

Radomir Šćepanović

Uticaj antioksidantne suplementacije ekstraktom  
biljke *Filipendula ulmaria* na manifestacije  
sistemske toksičnosti nanočestica  
kalcijumfosfata kod pacova

doktorska disertacija

Kragujevac, 2021.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Radomir Šćepanović

Influence of antioxidant supplementation with  
*Filipendula ulmaria* extract on the  
manifestations of systemic toxicity of calcium  
phosphate nanoparticles in rats

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2021.

## Идентификациона страница докторске дисертације

<b>Аутор</b>
Име и презиме: Радомир Шћепановић
Датум и место рођења: 02.04.1984., Београд
Садашње запослење: Војномедицинска академија, специјалиста оралне хирургије
<b>Докторска дисертација</b>
Наслов: Утицај антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на манифестације системске токсичности наночестица калцијум-фосфата код пацова
Број страница: 91
Број слика: 39
Број библиографских података: 114
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац
Научна област (УДК):
Ментор: др сци. мед. Драгица Селаковић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу
<b>Оцена и одбрана</b>
Датум пријаве теме: 25.08.2021.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: IV-03- 976/7, 15.12.2021.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
1. проф. др Гвозден Росић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник 2. доц. др Мирослав Васовић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Орална хирургија, члан 3. доц. др Марија Бубало, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Орална медицина, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
1. проф. др Гвозден Росић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник 2. доц. др Мирослав Васовић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Орална хирургија, члан 3. доц. др Марија Бубало, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Орална медицина, члан
Датум одбране дисертације:

### Identifikaciona stranica doktorske disertacije

<b>Autor</b>
Ime i prezime: Radomir Šćepanović
Datum i mesto rođenja: 02.04.1984., Beograd
Sadašnje zaposlenje: Vojnomedicinska akademija, specijalista oralne hirurgije
<b>Doktorska disertacija</b>
Naslov: Uticaj antioksidantne suplementacije ekstraktom biljke <i>Filipendula ulmaria</i> na manifestacije sistemske toksičnosti nanočestica kalcijum-fosfata kod pacova
Broj stranica: 91
Broj slika: 39
Broj bibliografskih podataka: 114
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac
Naučna oblast (UDK): Medicina, Fiziologija
Mentor: dr sci. med Dragica Selaković, docent Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu
<b>Ocena i obrana</b>
Datum prijave teme: 25.08.2021.
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske/umetničke disertacije: IV-03- 976/7, 15.12.2021.
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata:
1. prof. dr Gvozden Rosić, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Fiziologija, predsednik 2. doc. dr Miroslav Vasović, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Oralna hirurgija, član 3. doc. dr Marija Bubalo, docent Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu za užu naučnu oblast Oralna medicina, član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske/umetničke disertacije:
1. prof. dr Gvozden Rosić, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Fiziologija, predsednik 2. doc. dr Miroslav Vasović, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Oralna hirurgija, član 3. doc. dr Marija Bubalo, docent Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu za užu naučnu oblast Oralna medicina, član
Datum odbrane disertacije:

## Identifikaciona stranica doktorske disertacije

<b>Author</b>
Name and surname: Radomir Scepanovic
Date and place of birth: 02.04.1984., Belgrade
Current employment: Military Medical Academy, oral surgeon
<b>Doctoral Dissertation</b>
Title: Influence of antioxidant supplementation with <i>Filipendula ulmaria</i> extract on the manifestations of systemic toxicity of calcium phosphate nanoparticles in rats
No. of pages: 91
No. of images: 39
No. of bibliographic data: 114
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine, Physiology
Mentor: Assistant Professor Dragica Selakovic, M.D., Ph.D. Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
<b>Grade and Dissertation Defense</b>
Topic Application Date: 25.08.2021.
Decision number and date of acceptance of the doctoral/artistic dissertation topic: IV-03- 976/7, 15.12.2021.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate:
1. Prof. Gvozden Rosić, full professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific domain: Physiology, chairman 2. Miroslav Vasović, assistant professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific domain: Oral Surgery, member 3. Marija Bubalo, assistant professor of Medical Faculty of Military Medical Academy, University of Defense Belgrade, scientific domain: Oral Medicine, member
Commission for evaluation and defense of doctoral/artistic dissertation:
1. Prof. Gvozden Rosić, full professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific domain: Physiology, chairman 2. Miroslav Vasović, assistant professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific domain: Oral Surgery, member 3. Marija Bubalo, assistant professor of Medical Faculty of Military Medical Academy, University of Defense Belgrade, scientific domain: Oral Medicine, member
Date of Dissertation Defense:

## САЖЕТАК:

**Увод.** Калцијумфосфати, природно присутни у људском организму широко су прихваћени као материјали избора за регенерацију минерализованих ткива. Све већа примена калцијумфосфата нановеличине, са познатим утицајем на оксидативни статус, апоптозу, оштећења ДНК и морфофункционалне промене различитих органа, наметнула је потребу за расветљењем механизма њихове токсичности, као и примене природних антиоксиданата, међу којима је и екстракт биљке *Filipendula ulmaria*, као могућим начином превенције исте.

**Материјал и методе.** Истраживање је обухватило 42 мужјака Wistar-albino пацова подељених у седам једнаких група, третираних *per os* нано-калцијумфосфатима (хидроксиапатит – 17.8 mg/kg тм, трикалцијум фосфат хидрат – 11 mg/kg тм и аморфни калцијум фосфат – 9,65 mg/kg тм) самостално, или са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (100 mg/kg тм) дневно током 30 дана. Након жртвовања, одређиване су вредности биохемијских и хормонских индикатора функције јетре, бубрега и тестиса у серуму, вредности маркера оксидативног статуса и апоптозе, као и хистолошке промене ткива наведених органа.

**Резултати.** Резултати ове студије су показали да хронична системска примена нано-калцијумфосфата утиче на вредности биохемијских параметара и серумске концентрације полних хормона. Истовремено, уочено је повећање про-апоптотске и про-оксидативне активности, праћено хистолошким променама у ткивима јетре, бубрега и тестиса. Такође, резултати студије су потврдили протективни ефекат антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria*, који се манифестовао смањењем испољавања системске токсичности изазване нано-калцијумфосфатима.

**Закључак.** Резултати ове студије указују на потребу да се у будућим истраживањима потенцијалне медицинске примене материјала за надокнаду коштаног ткива, симултано укључи и систематска процена токсичности. Такође, потврђено је да примена антиоксидантне суплементације може бити корисна у превенцији системске токсичности изазване различитим формама нано-калцијумфосфата.

**Кључне речи:** нано-калцијумфосфати, *Filipendula ulmaria*, системска токсичност, полни хормони, оксидативни стрес, апоптоза, јетра, бубрег, тестис

## **ABSTRACT:**

**Introduction.** Calcium phosphates that naturally appear in human body are broadly accepted as the first choice materials for regeneration of mineralized tissues. A growing employment of nano-sized calcium phosphates, with confirmed impact on oxidative status, apoptosis, DNA damage, and morphofunctional alterations in various organs, implied the necessity for enlightning mechanisms of their toxicity, as well as the usage of natural antioxidants, including the *Filipendula ulmaria* extract, as a potential prevention.

**Materials and methods.** Forty two male Wistar-albino rats, divided into seven equal groups, *per os* treated with nano-sized calcium phosphates (hydroxyapatite - 17.8 mg/kg b.w., tricalcium phosphate hydrate – 11 mg/kg b.w. and amorphous calcium phosphate – 9.65 mg/kg b.w.) alone, or with the *Filipendula ulmaria* extract (100 mg / kg b.w.) daily for 30 days. After sacrificing, the values of biochemical and hormonal indicators for liver, kidney, and testes were determined in sera samples, as well as the oxidative stress and apoptotic markers, and histological alterations in those organs.

**Results.** The results of this study showed that chronic systemic administration of nano-sized calcium phosphates influenced the biochemical parameters and serum hormone levels. At the same time, it has been observed that increased pro-apoptotic and pro-oxidant activity were accompanied with histological alterations in liver, kidney, and testicle tissues. Also, the results of this study confirmed the protective role of antioxidant supplementation with *Filipendula ulmaria* extract that was manifested by attenuation of nano-sized calciumphosphates-induced toxicities,

**Conclusion.** The results of this study imply the necessity that simulataneous evaluation of systemic toxicities shoul be included in the future investigations of materials for potential medical replacement of bone tissue. Also, it has been confirmed that antioxidant supplementation may be beneficial in the prevention of systemic toxicities induced by various forms of nano-sized calcium phosphates.

**Keywords:** nano-sized calcium phosphates, *Filipendula ulmaria*, systemic toxicity, sex hormones, oxidative stress, apoptosis, liver, kidney, testis



## Захвалница

Ова докторска дисертација представља круну мог професионалног и личног развоја. Током докторских студија имао сам привилегију да сарађујем са врхунским стручним тимом у веома пријатној атмосфери. Зато желим да искористим ову прилику да се искрено и од срца захвалим људима који су били уз мене на овом путу.

Велику захвалност дугујем свом ментору, доц. др Драгици Селаковић, на великој помоћи и несебичном дељењу знања током писања докторске дисертације и докторских студија.

Немерљиву захвалност дугујем продекану, проф. др Гвоздену Росићу, на несебичној и великој помоћи током целих докторских студија. Од првог дана сам имао професорову подршку и имао велику привилегију да сарађујем са таквом стручном и људском величином који је свим својим докторантима пружао подршку и знање као да су његова деца.

Огромну захвалност дугујем декану проф. др Владимиру Јаковљевићу на великој подршци и веома пријатној сардњи током докторских студија који је несебично подржавао, делио знање и савете свим својим докторантима.

Велику захвалност исказујем целокупном колективу Катедре за физиологију Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу на несебичној подршци у раду и веома пријатној атмосфери током целих докторских студија.

Посебно желим да се захвалим својој породици на разумевању, подршци и великој жртви коју су поднели због моје одсутности и обавеза.

*Докторску дисертацију посвећујем мом оцу и мајци који су цео свој живот посветили да ме науче правим вредностима и завршим сва школовања у својој стручној области. Од дана мог рођења су били носачи авиона при мом сваком лету. Драги моји, неизмерно вам хвала на свему!*

## Садржај

1. УВОД.....	1
1.1. Трансплантација кости – опште напомене.....	2
1.2. Биолошки механизми регенерације костију .....	3
1.2.1. Остеогенеза.....	3
1.2.2. Остеоиндукција .....	3
1.2.3. Остеокондукција .....	4
1.2.4. Осеоинтеграција.....	4
1.3. Замена за коштаног ткиво .....	5
1.4. Калцијумфосфати као материјали за замену коштаног ткива – опште карактеристике .....	6
1.4.1. Хидроксиапатит .....	7
1.4.2. Трикалцијумфосфат .....	7
1.4.3. Аморфни калцијумфосфат .....	8
1.5. <i>In vivo</i> анимални модели у транслацијским истраживањима.....	9
1.6. Нежељени ефекти материјала за замену кости.....	12
1.6.1. Нежељени ефекти калцијумфосфата.....	12
1.7. Антиоксидантна суплементација као мера превенције оштећења изазваних наночестицама калцијумфосфата.....	13
1.7.1. Опште карактеристике и својства биљке <i>Filipendula ulmaria</i> .....	13
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА .....	15
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ .....	17
3.1. Експериментални дизајн .....	18
3.2. Одређивање параметара за процену системске токсичности наночестица калцијумфосфата и утицаја антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> .....	20
4. РЕЗУЛТАТИ .....	21
4.1. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на серумске нивое калцијума, креатинина и урее.....	22
4.1.1. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на ниво калцијума у серуму .....	22
4.1.2. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на серумски ниво креатинина.....	24
4.1.3. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане	

антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на серумски ниво урее.....	25
4.2. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на нивое триглицерида и холестерола (LDL, HDL, тотални холестерол и однос холестерола) у серуму.....	26
4.2.1. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на ниво триглицерида у серуму.....	26
4.2.2. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на ниво LDL холестерола у серуму.....	28
4.2.3. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на ниво HDL холестерола у серуму.....	29
4.2.4. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на ниво укупног холестерола у серуму.....	30
4.2.5. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на cholesterol ratio у серуму.....	31
4.3. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на промене нивоа LDH, ALP, ALT, AST, тестостерона и LH у серуму.....	32
4.3.1. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на промене нивоа лактат дехидрогеназе у серуму.....	32
4.3.2. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на промене нивоа алкалне фосфатазе у серуму.....	34
4.3.3. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на промене нивоа аланин аминотрансферазе у серуму.....	35
4.3.4. Утицај администрације наночестица калцијум-фосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на промене нивоа аспартат аминотрансферазе у серуму.....	36
4.3.5. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на промене нивоа тестостерона у серуму.....	37
4.3.6. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на промене нивоа лутеинизирајућег хормона у серуму.....	38

4.4. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на маркере оксидативног стреса и апоптотске маркере са репрезентативним Н&Е у бубрегу .....	39
4.4.1. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на промене индекса липидне пероксидације у ткиву бубрега .....	39
4.4.2. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на нивое супероксид дисмутазе у ткиву бубрега.....	41
4.4.3. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на нивое каталазе у ткиву бубрега .....	42
4.4.4. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на ниво укупног глутатиона у ткиву бубрега.....	43
4.4.5. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на релативну генску експресију проапоптотског гена – Вах у ткиву бубрега повезаних са апоптозом .....	44
4.4.6. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на релативну генску експресију антиапоптотског гена – Bcl-2 у ткиву бубрега повезаних са апоптозом.....	45
4.4.7. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на промене релативне генске експресије односа проапоптотских и антиапоптотских гена (Вах/Bcl-2) у ткиву бубрега повезаних са апоптозом .....	46
4.4.8. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на патохистолошке промене у ткиву бубрега .....	47
4.5. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на маркере оксидативног стреса и апоптотске маркере са репрезентативним Н&Е у јетри .....	48
4.5.1. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на промене индекса липидне пероксидације у ткиву јетре .....	48
4.5.2. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на промене нивоа супероксид дисмутазе (SOD) у ткиву јетре .....	50
4.5.3. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на промене нивоа каталазе у ткиву јетре .....	51

4.5.4. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на ниво глутатиона у ткиву јетре.....	52
4.5.5. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на релативну генску експресију проапоптотског гена – Вах у ткиву јетре повезаних са апоптозом ..	53
4.5.6. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на промене релативне генске експресије mRNA за Bcl-2 у ткиву јетре повезаних са апоптозом ....	55
4.5.7. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на релативну генску експресију проапоптотских и антиапоптотских гена – однос Вах/Bcl-2 у ткиву јетре повезаних са апоптозом .....	56
4.5.8. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на патохистолошке промене у ткиву јетре .....	58
4.6. Утицај администрације наночестица калцијум-фосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на маркере оксидативног стреса и апоптотске маркере са репрезентативним Н&Е у тестису .....	59
4.6.1. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на промене индекса липидне пероксидације у ткиву тестиса .....	59
4.6.2. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на промене нивоа супероксид дисмутазе у ткиву тестиса .....	61
4.6.3. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на промене нивоа каталазе у ткиву тестиса .....	62
4.6.4. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на нивое глутатиона у ткиву тестиса .....	63
4.6.5. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на релативну генску експресију проапоптотског гена – Вах у ткиву тестиса.....	64
4.6.6. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на релативну генску експресију антиапоптотског гена – Bcl-2 у ткиву тестиса .....	66
4.6.7. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на однос релативне генске експресије проапоптотских и антиапоптотских гена (однос Вах/Bcl-2) у ткиву тестиса.....	67
4.6.8. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане	

антиоксидантне суплементације екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на патохистолошке промене у ткиву тестиса.....	68
5. ДИСКУСИЈА.....	69
5.1. Нежељени ефекти хроничне примене калцијумфосфата .....	70
5.2. Утицај хроничне примене наночестица калцијумфосфата на бубрежно ткиво .....	71
5.2.1. Про-оксидативно деловање наночестица калцијумфосфата и протективно деловање екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на оксидативни еквилибријум у бубрежном ткиву.....	71
5.2.2. Про-оксидативно деловање наночестица калцијумфосфата и протективно деловање екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на апоптотске механизме у бубрежном ткиву.....	73
5.3. Утицај хроничне примене наночестица калцијумфосфата на ткиво јетре .....	74
5.3.1. Утицај наночестица калцијумфосфата на метаболичке функције јетре.....	74
5.3.2. Про-оксидативно деловање наночестица калцијумфосфата и протективно деловање екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на оксидативни еквилибријум у ткиву јетре .....	75
5.3.3. Про-оксидативно деловање наночестица калцијумфосфата и протективно деловање екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на апоптотске механизме у ткиву јетре .....	76
5.4. Утицај хроничне примене наночестица калцијумфосфата на ткиво тестиса .....	77
5.4.1. Про-оксидативно деловање наночестица калцијумфосфата и протективно деловање екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на оксидативни еквилибријум у ткиву тестиса.....	77
5.4.2. Про-оксидативно деловање наночестица калцијумфосфата и протективно деловање екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> на апоптотске механизме у ткиву тестиса.....	78
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	79
7. ЛИТЕРАТУРА.....	81
СКРАЋЕНИЦЕ .....	91

# **1. УВОД**

## 1.1. Трансплантација кости – опште напомене

Трансплантација кости је уобичајена хируршка процедура у ортопедији, стоматологији и неурохирургији а кост је уједно и друго најчешће коришћено трансплантационо ткиво (1). Оштећења костију се могу развити као резултат различитих патолошких стања, попут повреда, инфекција, тумора и операција (2). Трансплантација кости подразумева хируршку процедуру у којој се недостајуће ткиво замењује природним или вештачким материјалима. Идеја о замени недостајућег коштаног ткива постоји и позната је вековима уназад а докази за овај ортопедски третман пронађени су у египатској цивилизацији, па чак и раније, у праисторијском добу (3). У 19. веку забележене су прве успешне аутогене и алогене трансплантације од стране Van Meeren-а (4). Вековима уназад се трансплантација кости увежбавала коришћењем различитих некоштаних материјала природног порекла попут мермера, дрвета итд. али је проценат успешности био веома низак. 1892. године Dresmann са Тренделенбуршке клинике у Бону први пут је известио о успешној употреби париског гипса (калцијум сулфата) као замену недостајућег коштаног ткива код осморо пацијената (5). Убрзо након ових сазнања, материјал је испитиван у експериментима на животињама (6).

Кост је везивно ткиво сложене хијерархијске структуре. У ствари, кост представља орган који се састоји од неколико ткива – кортикалне кости, спонгиозне кости, коштане сржи и периоста (7). Ремоделација кости је константан процес током којег се кост стално обнавља. Сврха овог процеса је да осигура хомеостазу коштаних минерала, регенерише микропреломе или да омогући прилагођавање кости на ново механичко оптерећење (8). Фина равнотежа између остеобласта – ћелија које су одговорне за формирање коштаног ткива и остеокласта – ћелија одговорних за разградњу коштаног ткива, неопходна је за метаболизам и физиологију костију. Скелетни систем игра значајну улогу у структурној подршци, кретању и физичкој заштити унутрашњих органа. Штавише, поред складиштења минерала, коштани систем је место стварања и диференцијације крвних зрнаца и има важне хематопоетске и имунолошке функције (7). С обзиром на многобројне улоге коштаног ткива, регенерација коштаних дефеката кључна је за поновно успостављање облика и функције у телу (7).

Зарастање коштаног дефекта дуготрајан је процес обнове коштаног ткива. Због регенеративне способности коштаног ткива, већина коштаних дефеката може се спонтано излечити под одговарајућим физиолошким условима. Са друге стране, велики дефекти, познатији као критични дефекти костију, можда неће спонтано зарастати (9, 10). Опоравак критичних коштаних дефеката и даље је велики клинички изазов, упркос изузетном регенеративном капацитету кости. За реконструкцију великих коштаних сегмената или за попуњавање умереног губитка коштаног ткива, обично се користе коштани трансплантати или заменски биоматеријали.



## 1.2. Биолошки механизми регенерације костију

Коштана регенерација је сложени физиолошки процес стварања кости који је укључен у континуирано ремоделовање коштаног система током живота. Коштано ткиво поседује изузетну регенеративну моћ, па већина повреда зараста без формирања ожиљног ткива. Међутим, услед деловања различитих патолошких стања попут инфекција, траума, тумора или различитих системских болести које умањују регенеративну моћ, настају велики коштани дефекти који захтевају хируршку интервенцију уз примену материјала за замену коштаног ткива (11). Материјали који се апликују у циљу побољшаног зарастања коштаног ткива називају се коштани трансплантати или графтови. У основи коштане регенерације битна су четири механизма регенерације кости:

1. остеогенеза,
2. остеоиндукција,
3. остеоиндукција и
4. остеоинтеграција (12).

### 1.2.1. Остеогенеза

Остеогенеза или формирање кости представља трансформацију већ постојећег мезенхималног ткива у коштано ткиво, при чему се остеобласти и прекурсорске ћелије пресађују заједно са материјалом за замену коштаног ткива (13). У контексту коштане трансплантације, остеогенеза представља "остеогени" потенцијал трансплантата или способност остеопрогениторних ћелија донорског трансплантата да се размножавају и диференцирају до остеобласта и тако допринесу расту нове кости (12, 14, 15). Остеогенеза обухвата два наизменична процеса – процес изградње (апозиција) и разградње (ресорпција) кости и када су ова два процеса уравнотежена, одржава се хомеостаза коштаног ткива.

### 1.2.2. Остеоиндукција

Остеоиндукција представља стимулацију и активацију мезенхималних матичних ћелија домаћина или остеопрогениторних ћелија из околног ткива, које се диференцирају у остеобласте (12). Трансплантирани материјал одговоран је за преусмеравање локалних ћелија везивног ткива у ћелије које ће створити кост. Процес остеоиндукције води се и посредује различитим сигнаlima и активацијом ћелијских рецептора, посебно из породице TGF- $\beta$  (15).

### 1.2.3. Osteokondukcija

Osteokondukcija podrazumeva sposobnost koštanih ћелија, osteoblasta и osteoklasta, да се крећу дуж скафолда и полако га замењују новим коштаним ткивом (16). Ово својство се јавља када материјал за трансплантацију служи као скафолд за раст нове кости (14). Osteokonduktivни материјал дозвољава стварање коштаног ткива на његовој површини или дубље у његовој структури (17). Материјал са обе особине, osteokonduktivном и osteoinduktivном, поред улоге скафолда за већ постојеће osteoblaste, такође ће стимулисати диференцијацију нових osteoblasta промовишући бржу интеграцију трансплантата (14).

### 1.2.4. Oseointegracija

Коначни резултат повезивања кости домаћина и трансплантата назива се oseointegracija. Овај процес, који је временски зависан, дефинише се као процес зарастања при чему се постиже и одржава клинички асимптоматска крута фиксација алопластичних материјала у кости током функционалног оптерећења (18). Са становишта уградње зубног импланта, oseointegracija представља директно усидрење – функционалну анкилозу, стварањем коштаног ткива око импланта без формирања везивног ткива на споју кост-имплант (17). Недавна дефиниција каже да је то "феномен где се имплант тако споји са кости да је немогуће одвојити га без прелома" (19). Исход имплантације зависи од неколико фактора и њихове међусобне повезаности, попут: биокомпатибилности материјала, површине и дизајна импланта, квалитета кости на месту где се имплант уграђује као и хируршке технике имплантације (20). Излагање имедијатно уграђених импланата температуре вишој од 47 °C значајно може пореметити oseointegraciju импланта и онемогућити његово интегрисање у коштано ткиво (21).

### 1.3. Замена за коштано ткиво

Од материјала за трансплантацију очекује се да обезбеди механичку снагу, да поседује остеоиндуктивност и остеокондуктивност, као и да обезбеди одговарајући простор за васкуларизацију и ткивну инфилтрацију (22). Приликом одабира трансплантата, потребно је проценити одређене аспекте: биолошку прихватљивост, предвидљивост, клиничку изводљивост и минималне постоперативне последице (23).

Коришћење кости добијене од истог појединца који прима трансплантат назива се аутологна трансплантација кости (24). Златни стандард за рестаурацију коштаных дефеката је аутологно пресађивање кости. Сматра се да је златни стандард због његове хистокомпатибилности и неимуногених својстава (25). Такође, аутотрансплантати пружају оптимална остеоиндуктивна, остеокондуктивна и остеогена својства (15). Међутим, и недостаци су многобројни. Ови трансплантати повезани су са високом стопом постоперативних компликација попут хроничног бола на месту донирања или естетских недостатака (26, 27).

Најчешће бирани коштани трансплантат је алогографт – трансплантат који је добијен од друге особе, а не од особе која прима трансплантат. Алогографтови се често добијају из лешева и ткивних банака. Употреба ове врсте материјала повезана је са одређеним ограничењима од којих су најзначајнија изазивање имунолошког одговора и преношење различитих болести (28). Стога, алогографти се припремају коришћењем различитих техника осмишљених да умање имунолошки одговор домаћина и смање ризик од преношења болести. Међутим, технике припреме могу драстично ослабити биолошка и механичка својства иницијално присутна у коштаном ткиву (29, 30).

Данас постоји све веће интересовање за проучавање биоматеријала, направљених од природно изведених или синтетичких материјала како би се превазишла ограничења повезана са стандардним третманом коштаных трансплантата (31). Коштани заменици могу бити изведени из биолошких производа или синтетичких материјала. Деминерализовани коштани матрикс (*енгл.* Demineralized Bone Matrix, DBM) добијен је из људске кости уклањањем минералног матрикса киселином уз одржавање органског матрикса и фактора раста. DBM се углавном користи у сврхе пуњења (32). Плазма богата тромбоцитима (PRP) добијена из крви пацијената обично се користи као додатак другим материјалима (33).

Хидроксиапатит (НА) је примарна минерална компонента зуба и коштаног ткива. Карактерише се спором ресорпцијом и веома добрим механичким својствима. Доступан је у природној и вештачкој форми и може се користити сам или као део одговарајућих композитних материјала (32). Обазујући се на вештачке замене кости, калцијум-сулфати су уведени 1892. године (5), као што је раније и поменуто, међутим, тек недавно је прихваћен за генералну употребу (34). Иако његова примена има неке предности, попут сличности са костима и остеоиндуктивности, показује и неке недостатке, попут брзе ресорпције и одсуства остеоиндуктивности и остеогености, као и релативно честих локалних компликација (35). Вештачки скафолди формираны од калцијумфосфата су керамички, и широко се користе у стоматологији и ортопедији деценијама уназад (36).

## 1.4. Калцијумфосфати као материјали за замену коштаног ткива – опште карактеристике

Калцијумфосфати (CaPs) представљају једињења од посебног интереса у многим научним пољима, са растућом потребом за њиховом употребом у медицини. За разлику од синтетичких полимера који се користе у биомедицинске сврхе, ова метална једињења су и природно присутна у људском телу (37). С обзиром да CaPs показују највећи ниво биокомпатибилности, није изненађујуће што их тело добро прихвата и што су оптимално интегрисане у људско тело (38). Они су широко прихваћени као материјали избора за регенерацију тврдих ткива (39), вештачку замену кости (40) и лечење коштаних дефеката (41). Међутим, најчешћа примена CaPs-а је у различитим стоматолошким интервенцијама, попут ендодонтских третмана (42), облагања денталних импланата (43), неуспелих субпериосталних металних импланата (44), пародонталних дефеката (45), обнављања безубог атрофичног гребена (46).

Како је раније описано, CaPs је хемијски врло сличан костима и зубима сисара, а једна од главних карактеристика је биоактивност. Стога, у медицини се користи за различите индикације, попут смањења болова, обнављање функција оболелих или оштећених ткива. Користе се за зарастање коштаних дефеката, лечење прелома, аугментацију кости, примењују се у ортопедији, максилофацијалној хирургији и реконструкцији, рестауративној стоматологији и пародонтологији (47). Велики изазов са којим се медицина суочила крајем 1990-их година је регенерација уместо замене ткива. Својства CaPs-а која омогућавају претходно наведено индикационо подручје су биокомпатибилност, биоразградивост, биоактивност, остеокондуктивност итд. Будући да је главни циљ у ткивном инжењерингу стварање ткива и органа *de novo*, ћелијама је потребна подршка да се организују у тродимензионалном распореду (48).

Посматрано са клиничког становишта, спроведена су бројна истраживања са различитим CaPs полимерима, укључујући HA, монокалцијумфосфате, дикалцијумфосфате, TCP, тетракалцијумфосфате и ACP, као биоактивне компоненте композита (49). Међутим, недавни напредак у биоматеријалима усмерава клиничке индикације за примену CaPs на наночестице како би се повећао њихов потенцијал реминерализације (50).

### 1.4.1. Хидроксиапатит

Хидроксиапатит (НА) је неорганичко калцијумфосфатно једињење чија је хемијска формула  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Карактерише се највећим уделом у неорганичкој компоненти минерализованих ткива и уједно је и најстабилније једињење СаPs-а (51). Одликује га биокомпатибилност, остеокондуктивност, биоактивност, нетоксичност, неимуногеност, па самим тим представља идеалан материјал за замену коштаног ткива (52). Механичке карактеристике НА су изузетно добре. За добру механичку отпорност важан је садржај аморфне фазе, порозности и величине зрна. Механичка својства се побољшавају са смањењем порозности и величине зрна. Међутим, механичка отпорност је око 100 МПа, што је ниже од отпора људских костију, чија отпорност износи око 300 МПа (53). За биомедицинску примену је од посебног значаја порозност из неколико разлога: повећава површину, побољшава фиксацију импланта повећањем коштане везе, омогућава колонизацију и адхезију ћелија, урастање кости, васкуларизацију и биоресорпцију. Развијањем различитих величина пора, дефинисани су и различити циљеви. Макропорозност за циљ има колонизацију ћелија и бољу васкуларизацију, Микропорозност олакшава импрегнацију материјала флуидима, обезбеђује бољу растворљивост, док нанопорозност омогућава бољу адхезију, пролиферацију и диференцијацију ћелија (51). Последњих година, са развојем нанотехнологије, примена НА постала је све интензивнија. Величина и облик НА утичу на обим реминерализације тврдих зубних ткива, па се наночестицама НА приписује боља способност реминерализације почетних каријесних лезија у поређењу са микро и макрочестицама (54). Наночестице НА карактеришу се већом растворљивошћу и имају израженију биоактивност у поређењу са већим честицама, самим тим имају велики потенцијал за обнављање и аугментацију коштаног ткива.

### 1.4.2. Трикалцијумфосфат

Трикалцијумфосфат (ТСР) је неорганичко једињење са хемијском формулом  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Дуги низ година остају у фокусу истраживања у области науке о неорганичким медицинским материјалима. ТСР је форма СаPs-а која је изузетно биоразградива. Познате су 3 модификације ТСР-а –  $\alpha$ -ТСР,  $\alpha'$ -ТСР и  $\beta$ -ТСР.  $\alpha$ -ТСР представља стабилну фазу између 1120 и 1470 °С,  $\alpha'$ -ТСР је фаза стабилна изнад 1470 °С, док је за  $\beta$ -ТСР карактеристично да је фаза стабилна при повишеном притиску. Иако се  $\beta$ -ТСР најчешће се користи у медицинске сврхе,  $\alpha$ -ТСР често се користи као компонента прашкасте смеше за добијање биокомпатибилних цемената СаPs-а (55). Растворљивост измерена у физиолошким условима на 25 °С је 0.3 mg/L, 0.5 mg/L и 2.5 mg/L за НА,  $\beta$ -ТСР,  $\alpha$ -ТСР, редом, што их чини погодним за хируршке импланте.  $\alpha$ -ТСР је нашао примену у рестауративној стоматологији због боље растворљивости, док је  $\beta$ -ТСР стабилније структуре и мање биоразградивости, па је примену нашао у хирургији – регенерацији коштаног ткива (56). У циљу побољшања механичких својстава додају се Mg и Si при чему су параметри затезне чврстоће значајно побољшани. Забележене су велике чврстоће на притисак у широком опсегу од 5-500 МПа (57). У облику праха, користи се у порцелану и денталним материјалима. Такође, користи се и као замена ткива за регенерацију коштаных дефеката посебно када аутогену трансплантацију кости није могућа.

### 1.4.3. Аморфни калцијумфосфат

Аморфни калцијумфосфат (АСР) представља посебну врсту соли калцијум-фосфата иако се донедавно сматрао индивидуалним хемијским једињењем. Хемијска формула АСР-а је  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$ , при чему састав јако зависи рН вредности и концентрације јона калцијума и фосфата. С обзиром на хемијску и структурну свестраност, У воденим растворима веома брзо прелази у стабилну кристалну фазу попут НА. АСР је веома важан као пролазни интермедијум у формирању апатитног неорганског матрикса костију и зуба (58). Физички и морфолошки, тешко је утврдити присуство АСР-а у скелетном ткиву па је доказивање и присуство АСР-а предмет значајне расправе. Једна од могућности која би могла објаснити тежину утврђивања АСР-а је да АСР не постоји као засебне честице већ као аморфни слој на кристалима лоше кристалне фазе биолошког апатита. Иако нема директних доказа за ову могућност, чини се да се слични премази формирају у физиолошки сличним растворима засејаним НА у *in vitro* условима (59). Како су биоматеријали и биокерамички СаРс данас доступни у различитим физичким облицима (прашкови, честице, грануле, инјекционе формулације, самовезујући цементи, премази за импланте...), очекује се да би се АСР могао наћи у свим претходно наведеним облицима. Међутим, због једноставности припреме, најчешће се налази у форми праха. За употребу у хирургији, све конструкције морају имати потребна механичка својства, што није лако постићи у случају АСР-а, па се мора спроводити синтеровање на температурама вишим од 1000 °С. Коришћење АСР-а обезбеђује биокомпатибилност, биоактивност и бољу адхезију ћелија. У киселој средини, ослобађају јоне калцијума и ортофосфата који потенцијално могу учествовати у реминерализацији глеђи (60). Релативно нестабилна и динамичка природа АСР-а чини га веома атрактивним и свестраним за различите примене у биомедицинској области. Због својих хемијских и структуралних сличности са калцификованим ткивима сисара, у медицини се чисти АСР користи у СаРс цементима и као материјал за пуњење у стоматологији. Биоактивни композити АСР-а са полимерима имају све карактеристике погодне за употребу у конзервативној стоматологији и коштаног регенерацији (61).

## **1.5. *In vivo* анимални модели у транслацијским истраживањима**

Материјали који замењују кост се морају тестирати у *in vitro* и *in vivo* условима помоћу анималних модела пре него да се започне испитивање на људима. Успостављање одговарајућег анималног модела је суштински корак у истраживању и процени материјала заменика костију. Треба имати на уму да се резултати добијени у *in vivo* студијама на животињама често разликују у односу на одређена клиничка стања (62). За одабир одређене животињске врсте, као модел за тестирање морају се узети у обзир различити фактори. Оно што је најважније, изабрани анимални модел требало би да јасно показује аналогије у поређењу са људима, како физиолошке тако и патофизиолошке. Мале животиње попут глодара, погодне су за истраживање патофизиологије и патогенезе, а велике животиње се често користе за проучавање хроничних болести и могућности лечења (Табела 1.) (8).

Табела 1. Карактеристике анималних модела у студијама коштаних дефеката

Животињске врсте	Топографија дефекта кости	Предности	Недостаци
<b>Глодари</b>	Фемур Калварија	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Мала величина</li> <li>• Једноставан за руковање</li> <li>• Одговарајући животни век</li> <li>• Цена</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Дуге кости мале величине</li> <li>• Танки и крхки кортекси</li> <li>• Одсутно ремоделирање типа Haversian у кортексу</li> </ul>
<b>Свиња</b>	Краниофацијалне кости	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Анатомија кости</li> <li>• Способност лечења</li> <li>• Ремоделација слична људској</li> <li>• Слична минерална густина и концентрација кости</li> <li>• Ламеларна структура кости</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Гушћа трабекуларна мрежа</li> <li>• Тешко руковање</li> <li>• Краће тибија и фемур</li> <li>• Велике стопе раста</li> <li>• Веома велика телесна тежина</li> </ul>
<b>Овце</b>	Тибија	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Телесна тежина слична одраслим људима</li> <li>• Једноставна за руковање</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Значајно већа густина трабекуларне кости</li> <li>• Већа чврстоћа кости</li> <li>• Већа количина урастања кости</li> </ul>
<b>Зец</b>	Тибија Фемур	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Лака за руковање</li> <li>• Мала величина</li> <li>• Рана скелетна зрелост</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Мала величина</li> <li>• Разлике у анатомији кости</li> <li>• Бржа промена скелета коштана обнова</li> </ul>

*Прилагођено према: Li и сарадници (9)*

Глодари су један од најчешће коришћених животињских модела у испитивању биоматеријала као коштаних заменика и регенерације коштаног ткива (63). Ови сисари се углавном користе за метаболичке и регенеративне студије коштаног ткива везане за узраст јер њихова биологија кости снажно зависи од старости и пола (64). Међутим, постоје очигледна ограничења у коришћењу модела глодара. Глодари имају дугачке кости мале величине и танке и крхке кортексе док је садржај трабекуларне кости ограничен (65). Такође, Хаверсова ремоделација се не дешава код ових животиња (63). Имајући у виду све недостатке, глодари се ипак широко користе у проучавању материјала заменика кости, углавном као модел дефекта критичне величине, најмањих рана које се налазе унутар кости, које не могу спонтано зарастати током живота животиње (66).

Претклиничка испитивања материјала за замену кости такође се широко спроводе и код великих скелетних животиња, укључујући свиње, псе, козе и овце. Посебна специфичност ових животиња огледа се у томе да су структура и састав коштаног ткива веома слични као и код људи (67). У претклиничким студијама, усредсређеним на процесе повезане са величином тела или метаболичким карактеристикама попут биомеханике, врсте експерименталних животиња требале би бити што ближе човеку (68). Овце и козе су погодне за тестирање импланата и протеза због њихове телесне тежине и дугих кости (69). Иако њихове кости имају макроструктуру сличну људској, код оваца се кост



предоминантно састоји од примарне коштане структуре за разлику од људи и оне имају значајно већу густину у поређењу са људским костима (70). Међутим, без обзира на уочене разлике у коштаномј микроструктури, студије су забележиле да овце показују сличну преградњу кости у односу на људске кости (71). Модел дефекта тибије оваца се широко користи за испитивање материјала заменика кости у коштаномј регенерацији (72, 73).

С обзиром на анатомију, морфологију, метаболизам и минералну густину кости, свиње се сматрају блиским репрезентативним моделима истраживања људског коштаног система (74, 75). Такође, хистологија коштаног ткива и структура ламеларне кости слична је оној код људи (76). Недостаци овог животињског модела односе се на дужину тибије и фемура с обзиром да је релативно мала и стога неприкладна за проучавање импланата. Такође, велика телесна тежина чини их неприкладним за ортопедска истраживања (9), док са друге стране, модел краниофацијалних коштаних дефеката широко се користи за испитивање биоматеријала заменика кости код ових животиња (9).

## 1.6. Нежељени ефекти материјала за замену кости

Примена коштаних биоматеријала изазива каскаду реакција у биолошком окружењу. Биокомпатибилност и дуготрајност трансплантата одређени су ткивом домаћина, заједно са физичко-хемијским карактеристикама биоматеријала. Нежељене реакције на трансплантат у телу могу бити различите и укључују реакције типа страног тела, хроничне упале, инфекције, реакције преосетљивости итд. (77).

Биоматеријали потенцијално могу изазвати токсични ефекат на ткива домаћина, у смислу акутне токсичности самог материјала или хроничне токсичности услед трошења материјала током времена. Заменски биоматеријали могу се временом ослободити при чему ситне честице дебриса и хронични ефекти истих постају главни индикатори у процени токсичности (78).

Стога, од претклиничких студија се очекује да истраже различите аспекте дугорочног утицаја ових материјала на ткиво домаћина, као што су цитотоксичност, генотоксичност, системска акутна, субакутна и хронична токсичност и канцерогеност. *In vivo* студије једињења калцијумфосфата, материјала који се широко користи у регенеративним клиничким третманима, показале су да ослобађање нано величине калцијумфосфата може имати хронични хепатотоксични ефекат (79). Надаље, наночестице трикалцијум фосфата (ТСП) уграђене у дефекте тибије зеца изазвале су прекомерну и продужену упалну реакцију повезану са смањеном регенерацијом кости (80). Недавна студија показала је да дуготрајна примена наночестица НА или ТСП има значајан продепресивни ефекат код глодара. Такође, продужени третман аморфним калцијумфосфатом (АСР) резултирао је значајним падом когнитивних функција, па су и нежељени ефекти били праћени повећаним оксидативним оштећењима и апоптозом у префронталном кортексу (81).

### 1.6.1. Нежељени ефекти калцијумфосфата

Упркос бројним студијама које су довеле до закључка о апсолутној сигурности ових композита, објављено је да је медицинска примена СаPs-а праћена неколицином нежељених ефеката. Иако постоји само неколико извештаја који процењују токсичност наночестица СаPs-а, могуће је приметити да постоји евидентна сагласност у њиховим резултатима. Наиме, потврђено је да примену наночестица СаPs-а (НА, ТСП, АСР) прате различите системске морфо-функционалне абнормалности. У *in vitro* и *in vivo* истраживањима, примена ових честица резултирала је повећањем оксидативног стреса (82), апоптозом (83) и оштећењем ДНК (84), праћене разним структурним променама. Примена наночестица СаPs-а значајно је утицала на многа ткива и органе. У зависности од испитиваног система органа, постоје потврде о неуротоксичности (81), нефротоксичности (85), хепатотоксичности (86) и гонадотоксичности (87). Будући да уобичајени патофизиолошки механизми токсичности наночестица СаPs-а укључују оксидативно оштећење и последичну апоптозу, није изненађујуће што је примена антиоксидантне суплементације постала рутински поступак у лечењу токсичности изазваних овим честицама СаPs-а. У исто време, употреба природних производа, као једињења која обилују антиоксидативним одбрамбеним потенцијалом, тренутно је тема од интереса за медицинску примену.

## 1.7. Антиоксидантна суплементација као мера превенције оштећења изазваних наночестицама калцијумфосфата

Традиционална медицина обухвата многобројне лековите биљке које се деценијама уназад користе за лечење различитих обољења. Иако је у фармацеутској индустрији доминантна употреба синтетичких препарата, све је више нових лекова у чијој су основи природни производи, предоминантно биљног порекла. Самим тим, природни препарати дају значајан допринос здравственој заштити (88). Данашњи ставови говоре да се природни препарати ограничавају на превенцију и терапију блажих облика болести (89, 90), мада постоје клиничке студије које су показале да је делотворност ових препарата подједнака учинку синтетичких производа (91).

Примена наночестица са собом носи значајне бенефите како у превенцији, тако и у терапији различитих обољења, међутим, нежељени ефекти које ове честице могу изазвати су бројне. Како се растварањем различитих форми СаPs-а ослобађају одређене концентрације јона (92), очекивани дисбаланс може утицати на промене у оксидативном статусу и последичну апоптозу, као главни вид ћелијске смрти узроковане наночестицама (82, 93). Самим тим, изгледа да би примена антиоксидантне суплементације могла утицати на уравнотежење оксидативног стреса и ублажити нежељене ефекте настале након примене наночестица СаPs-а. Антиоксиданси су молекули који могу спречити оксидацију других молекула, чиме стабилизују и спречавају покретање оксидативног стреса који узрокује оштећење ћелија. Најважнији извори антиоксиданаса су витамини (С, Е, А), каротеноиди (бета-каротен, ликопен, лутеин), флавоноиди (танини, кверцетин, ресвератрол), препарати природног порекла и многи други. Природни препарати се могу угрубо поделити на антиоксидативне минерале, антиоксидативне витамине и фитохемијска једињења (94). Један од природних препарата са дугој историјом коришћења у медицинске сврхе је и екстракт биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim (FU).

### 1.7.1. Опште карактеристике и својства биљке *Filipendula ulmaria*

*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim (FU), у народу познатија као медуника, је вишегодишња, зељаста биљка која припада фамилији *Rosaceae*. Историја коришћења ове биљке у медицинске сврхе је веома дуга. Екстракт FU богат је фенолним једињењима и сматра се да су управо фенолна једињења одговорна за све биолошке активности. У сврхе лечења користе се сви делови биљке (цвет, лист и корен). У надземном делу биљке постоји значајан садржај фенолних једињења, посебно фенолних киселина и флавоноида (95). Екстракт биљке има низ фармаколошких активности (96). Због потврђених антиоксидативних, антимикуробних, антиинфламаторних и антипролиферативних својстава (97, 98), FU се и даље широко истражује и испитује. Поред наведених, такође испољава и антихипертензивни ефекат, хепатопротективно и ренопротективно дејство, а све је више

навода који упућују да испољава и неуропротективно дејство. Арсенијевић и сарадници потврдили су користан одговор екстракта FU у превенцији бихејвиоралних манифестација у неуротоксичности изазваној наночестицама CaPs-a (81).

Антиоксидативна активност екстракта FU је изузетна и заснива се на присуству великог броја полифенола који имају способност да реагују са ROS и активирају антиоксидативне ензиме и тако повећавају антиоксидативне особине ниско-молекулских антиоксиданата (99, 100). Такође, FU делује инхибиторно на синтезу простагландина и самим тим остварује антиинфламаторну активност. Антимикробно деловање остварује захваљујући високом садржају салицилне киселине и флавоноида (96) па FU испољава антимикробни ефекат на гљивицу *Candida albicans* (101).

## **2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА**

На основу претходно разматраних података и недовољних сазнања из литературе, дефинисани су следећи циљеви истраживања:

1. Процена потенцијалних нежељених системских ефеката различитих облика калцијумфосфата примењених у форми наночестица, испитивањем морфо-функционалног статуса бубрега, јетре и тестиса.

2. Утврђивање антиоксидативног ефекта екстракта биљке *Filipendula ulmaria*, услед потенцијалних нежељених системских ефеката након примене наночестица калцијумфосфата.

3. Утврђивање промена вредности параметара оксидативног стреса и апоптозе у ткивима јетре, бубрега и тестиса пацова третираних наночестицама калцијумфосфата самостално или са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria*.

### **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

### 3.1. Експериментални дизајн

Истраживање је конципирано као експериментална студија на материјалу анималног порекла *in vitro*, и спроведено на 42 Wistar albino пацова (мушјаци, старости 8-10 недеља, телесне масе  $\approx$  250-300 g) са Одељења за узгој лабораторијских и експерименталних животиња, Војномедицинска академија Београд. Смештај животиња је организован у групама од по 3, у одговарајућим кавезима, при контролисаним условима окружења (температура –  $23\pm 1^\circ\text{C}$ , циклус светло/мрак – 12/12h), уз неограничен приступ води и храни током реализације претретмана (месец дана). Спроведене експерименталне процедуре су извођене у складу са прописаним актима (EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC) и ARRIVE упутству.

Истраживања су спроведена на животињама распоређеним у седам (7) експерименталних група са по 6 животиња:

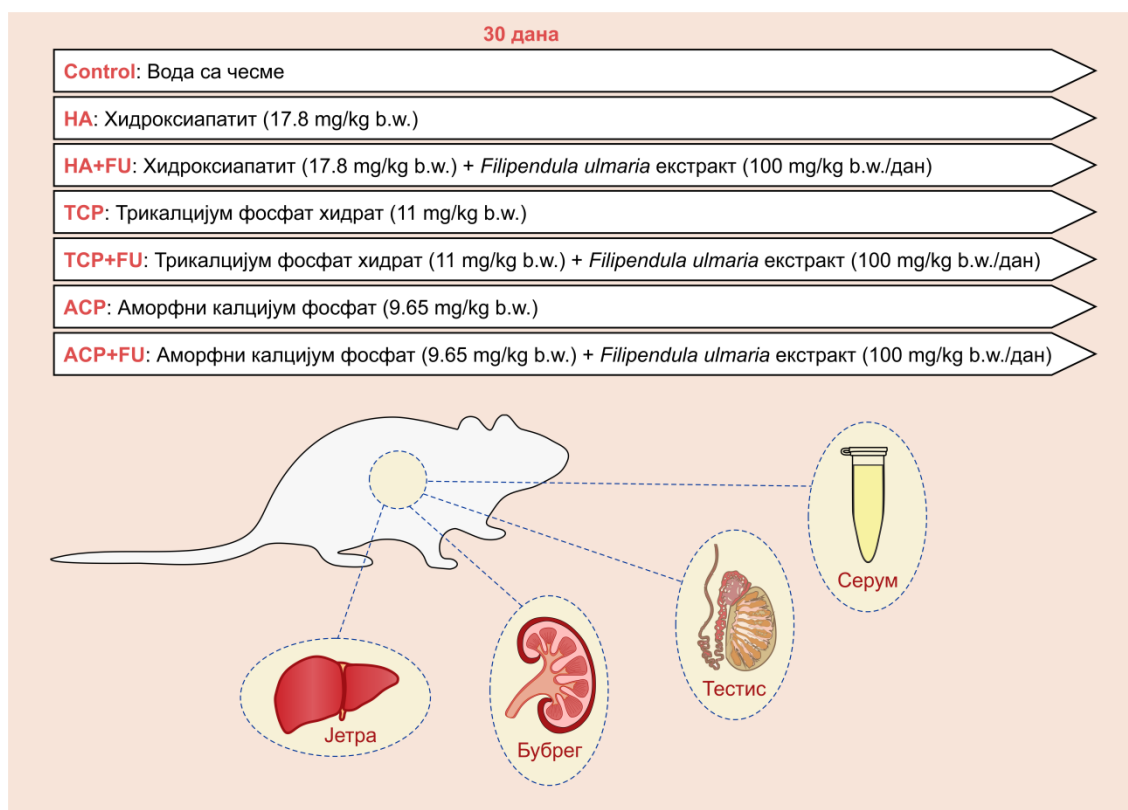
1. група CONTROL (контролна група) – са стандардним уносом хране и воде;
2. група HA (група третирана хидроксиапатитом) – примена наночестица хидроксиапатита у концентрацији од 17.8 mg/kg тм, *per os*;
3. група TSP (група третирана трикалцијум фосфат хидратом) – примена наночестица трикалцијум фосфат хидрата у концентрацији од 11 mg/kg тм, *per os*;
4. група ACP (група третирана аморфним калцијумфосфатом) – примена наночестица аморфног калцијумфосфата у концентрацији од 9.65 mg/kg тм, *per os*;
5. група HA+FU (група симултано третирана хидроксиапатитом и екстрактом биљке *Filipendula ulmaria*) – примена наночестица хидроксиапатита у концентрацији од 17.8 mg/kg тм заједно са FU екстрактом у концентрацији од 100 mg/kg тм, *per os*;
6. група TSP+FU (група симултано третирана трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке *Filipendula ulmaria*) – примена наночестица трикалцијум фосфат хидрата у концентрацији од 11 mg/kg тм заједно са FU екстрактом у концентрацији од 100 mg/kg тм, *per os*;
7. група ACP+FU (група симултано третирана аморфним калцијумфосфатом и екстрактом биљке *Filipendula ulmaria*) – примена наночестица аморфног калцијумфосфата у концентрацији од 9.65 mg/kg тм заједно са FU екстрактом у концентрацији од 100 mg/kg тм, *per os*.

Да би се симулирао типични начин уноса у организам, апликоване супстанце су претходно растворене у води за пиће. Дневни унос је континуирано праћен на дневном нивоу (током читавог претретмана) са дневним корекцијама у циљу постизања жељене концентрације испитиваних супстанци. Примењене дозе калцијумфосфата су утврђене према резултатима истраживања којима је доказана биолошка активност (81), поштујући принцип еквимоларности. Припрема екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (надземни делови), као и дефинсање састава екстракта (квалитативно и квантитативно), су спроведени у складу са утврђеном процедуром (96). Постизање финалне концентрације екстракта на дневном нивоу је остварено уз поштовање истих принципа који су описани за



унос наночестица калцијумфосфата.

Након завршетка претретмана (24 сата по последњем пероралном уносу активних супстанци), експерименталне животиње су анестезиране комбинацијом кетамина (10 mg/kg тм) и ксилазина (5 mg/kg тм), и декапитоване на гилјотини, уз симултано прикупљање узорака крви. Узорци крви су потом коришћени за одређивање вредности биохемијских параметара и анализу концентрације полних хормона. Хируршким путем се приступало издвајању узорака ткива јетре, бубрега и тестиса у циљу одређивања параметара оксидативног статуса и апоптозе, као и хистолошких промена изазваних наведеним третманима. На Слици 1. је представљен схематски приказ експерименталних процедура спроведених у овој студији.



Слика 1. Експериментални дизајн.

### **3.2. Одређивање параметара за процену системске токсичности наночестица калцијумфосфата и утицаја антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria***

Одређивање биохемијских параметара у серуму је обухватало утврђивање концентрација:

1. креатинина ( $\mu\text{mol/L}$ ),
2. урее ( $\text{mmol/L}$ ),
3. калцијума ( $\text{mmol/L}$ ),
4. триглицерида ( $\text{mmol/L}$ ),
5. укупног холестерола ( $\text{mmol/L}$ ),
6. HDL холестерола ( $\text{mmol/L}$ ),
7. LDL холестерола ( $\text{mmol/L}$ ),
8. лактат дехидрогеназе (LDH) (U/L),
9. алкалне фосфатазе (ALP) (U/L),
10. аланин аминотрансферазе (ALT) (IU/L), и
11. аспартат аминотрансферазе (AST) (IU/L).

Детаљна процедура је спроведена према описаној методологији (102).

Одређивање параметара хормонског статуса у серуму је обухватало утврђивање концентрација:

1. тестостерона ( $\text{ng/mL}$ ), и
2. лутеинизирајућег хормона (LH) ( $\text{mIU/mL}$ ).

Детаљна процедура је спроведена према описаној методологији (102).

Параметри за (спектрофотометријску) анализу оксидативног статуса у ткивима јетре, бубрега и тестиса су подразумевали квантификацију:

1. активности каталазе (U/mg протеина),
2. активности супероксид дисмутазе (U/mg протеина),
3. укупног глутатиона ( $\text{mg/g}$  протеина), и
4. индекса липидне пероксидације (изражен као TBARS,  $\text{nmol/mg}$  протеина).

Детаљна процедура је спроведена према описаној методологији (102).

Параметри за процену апоптотске активности („real-time PCR“ метод) у ткивима јетре, бубрега и тестиса су обухватили:

1. релативну експресију проапоптотских гена – Вах, и
2. релативну експресију антиапоптотских гена – Bcl-2.

Детаљна процедура је спроведена према описаној методологији (102).

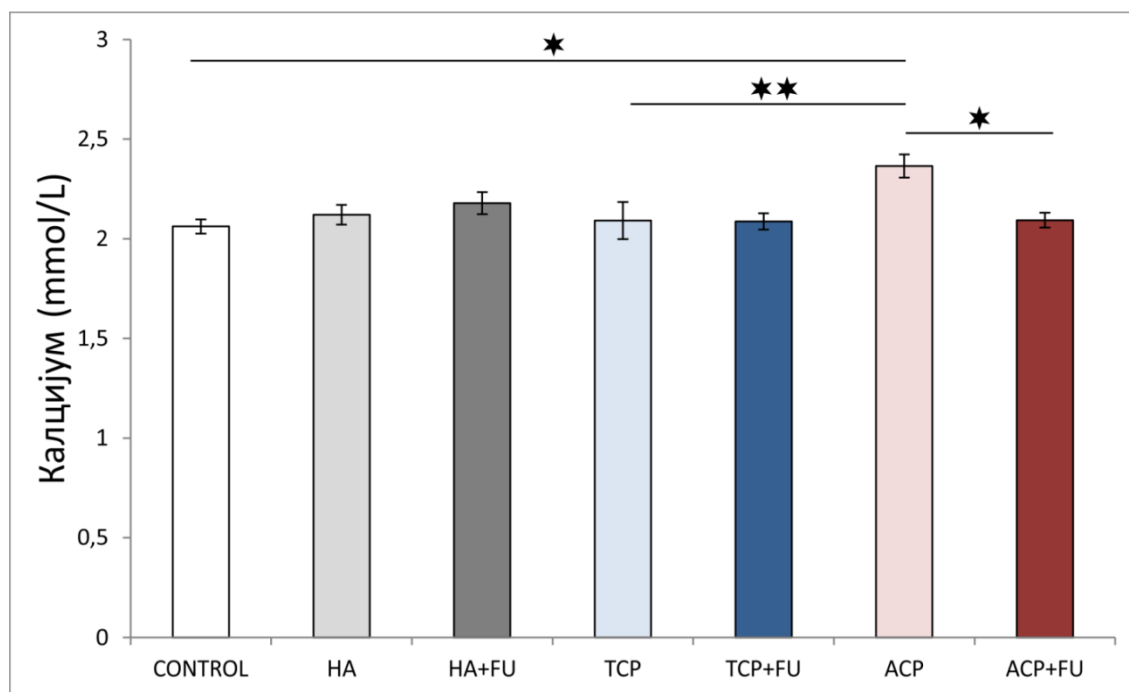
Утврђивање морфолошких карактеристика ткива испитиваних органа је спроведено применом одговарајуће хистолошке анализа ткива, а уз примену описане методологије (102).

## **4. РЕЗУЛТАТИ**

## 4.1. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на серумске нивое калцијума, креатинина и урее

### 4.1.1. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на ниво калцијума у серуму

Као што је приказано на слици 2.1., продужени унос наночестица CaPs-а довео је до значајне промене нивоа калцијума у серуму ( $F=3.517$ ,  $df=6$ ). Највећа калцемија примећена је у АСР групи. Повећање нивоа калцијума у серуму у АСР групи било је значајно и у поређењу са контролном ( $p<0.05$ ) и TCP групом ( $p<0.01$ ). Међутим, истовремена антиоксидантна суплементација екстрактом FU значајно је смањила хиперкалцемију изазвану АСР-ом ( $p<0.05$ ), чиме се ниво калцијума у серуму вратио на контролне вредности. За разлику од АСР+FU групе, преостале две комбиноване групе нису показале значајан утицај на серумски ниво калцијума.

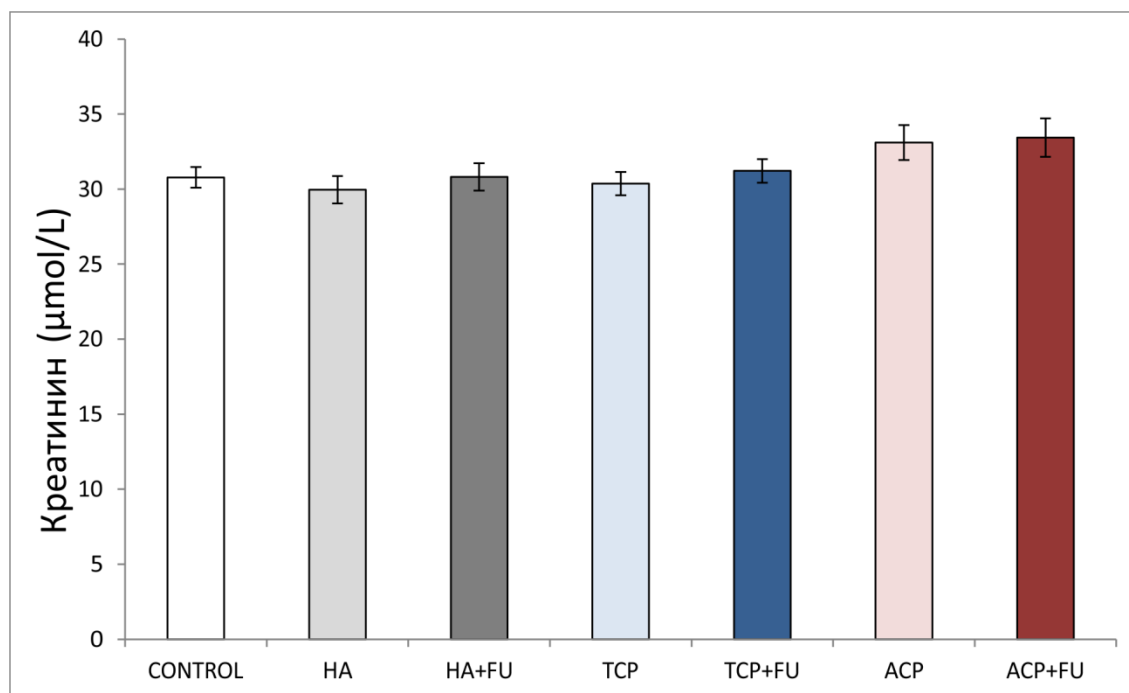


Слика 2.1. Вредности концентрације калцијума у серуму након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, АСР – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU

екстрактом, ТСП+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, АСП+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као \* $p < 0.05$  и \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.1.2. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на серумски ниво креатинина

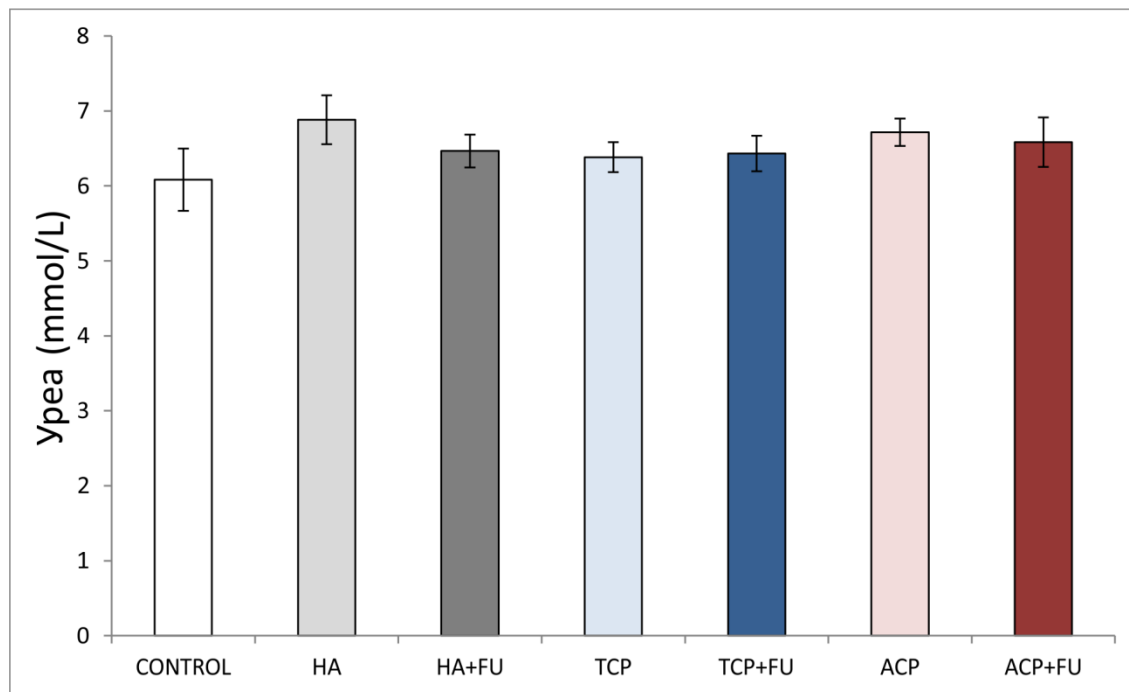
Иако продужени унос наночестица CaPs-а није значајно утицао на серумски ниво креатинина (Слика 2.2.,  $F=2.002$ ), уочава се да је највећа промена нивоа креатинина у серуму примећена у ACP+FU групи.



**Слика 2.2.** Вредности концентрације креатинина у серуму након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, ACP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, ACP+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као \* $p<0.05$  и \*\* $p<0.01$ .

#### 4.1.3. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на серумски ниво уреје

Као што је приказано на Слици 2.3., протоколи спроведени у овој студији нису утицали на ниво уреје у серуму ( $F=0.810$ ).

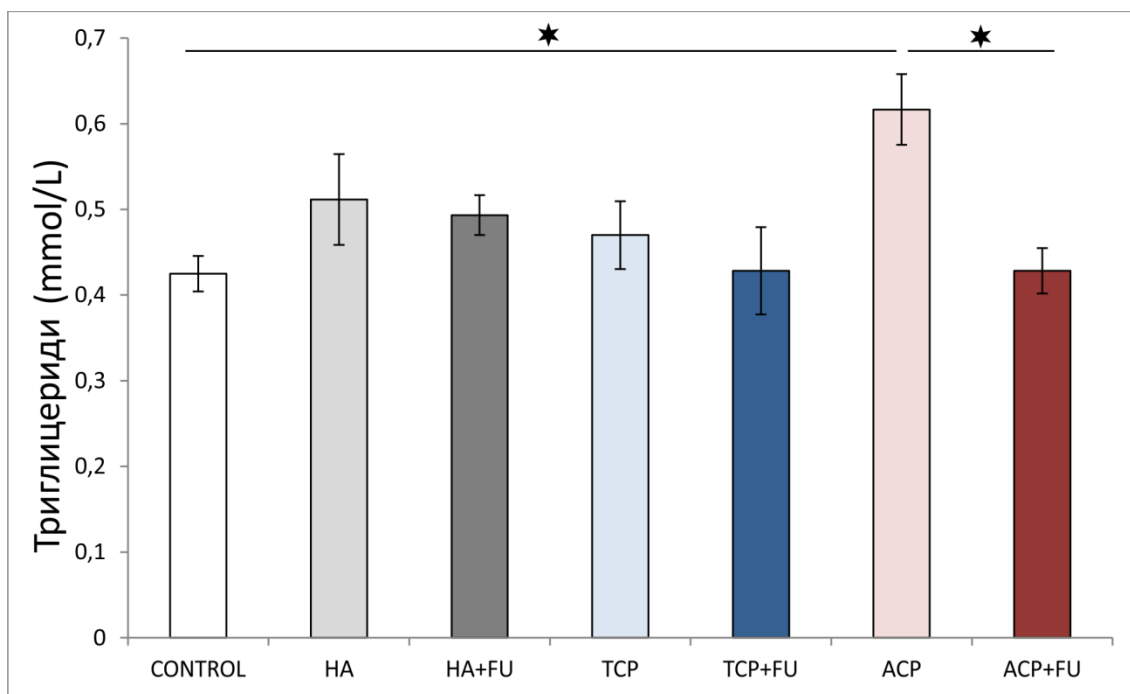


**Слика 2.3.** Вредности концентрације уреје у серуму након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, ACP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, ACP+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као \* $p<0.05$  и \*\* $p<0.01$ .

## 4.2. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на нивое триглицерида и холестерола (LDL, HDL, тотални холестерол и однос холестерола) у серуму

### 4.2.1. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на ниво триглицерида у серуму

Серум маркери липидног статуса били су значајно погођени продуженом оралном применом наночестица СаPs-а (Слика 3). Као што је приказано на слици 3.1., ниво триглицерида у серуму био је значајно изнад контролних вредности ( $p < 0.05$ ,  $F = 3.192$ ) код пацова који су третирани искључиво АСП-ом. Након примене екстракта FU ( $p < 0.05$ ), вредности су снижене и сведене на ниво контролних вредности. Преостале две форме СаPs-а нису показале значајан утицај на промене нивоа триглицерида у серуму.



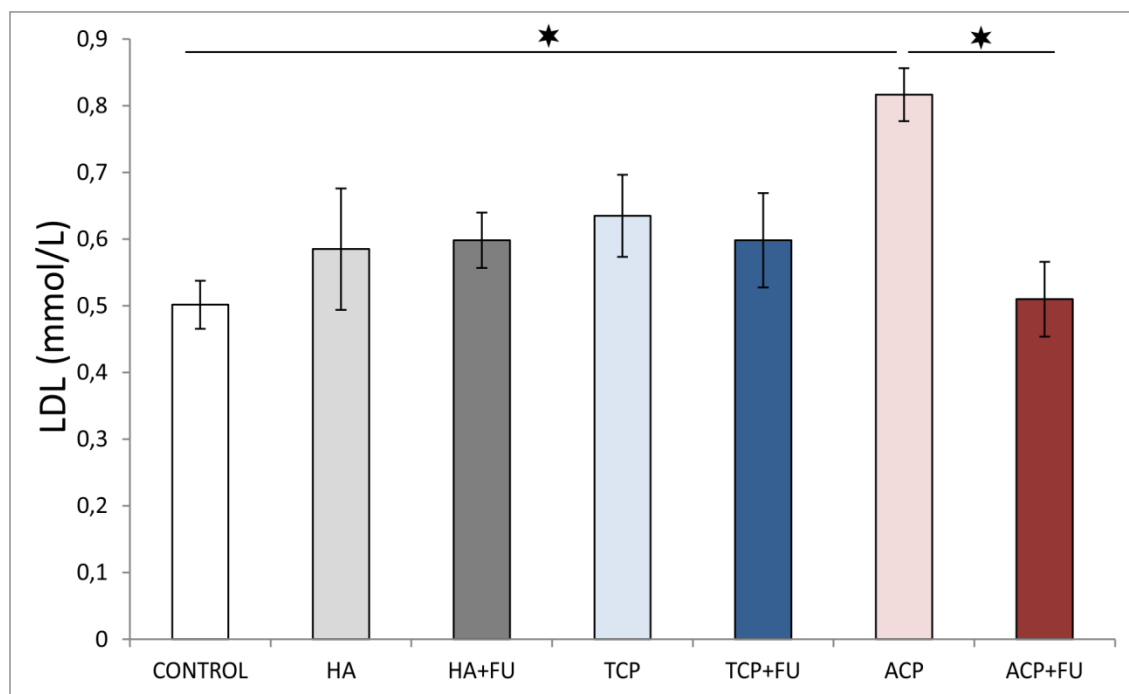
Слика 3.1. Вредности концентрације триглицерида у серуму након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, ACP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и



FU екстрактом, АСР+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као \* $p < 0.05$  и \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.2.2. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на ниво LDL холестерола у серуму

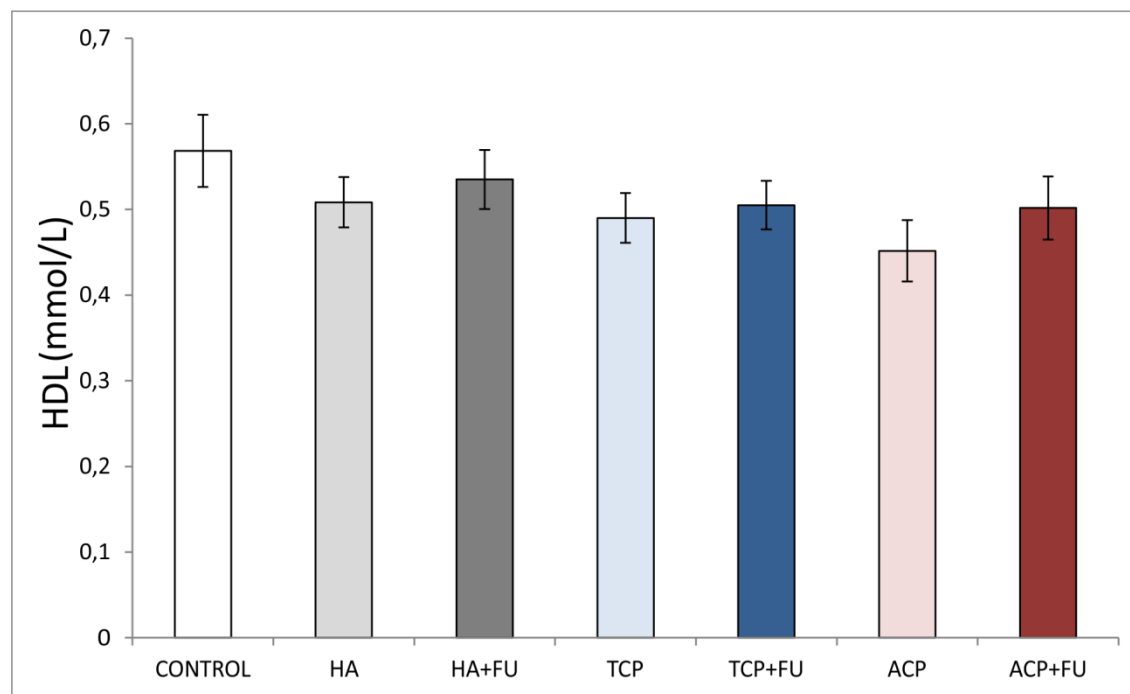
Серумски ниво LDL холестерола (Слика 3.2.) био је значајно изнад контролних вредности ( $p < 0.05$ ,  $F = 3.086$ ) код пацова који су третирани искључиво АСР-ом. Антиоксидантна суплементација екстрактом биљке FU утицала је на значајан пад вредности LDL холестерола у серуму ( $p < 0.05$ ) а вредности су сведене на ниво контролних вредности.



**Слика 3.2.** Вредности концентрације LDL холестерола у серуму након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, АСР – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, АСР+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као \* $p < 0.05$  и \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.2.3. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на ниво HDL холестерола у серуму

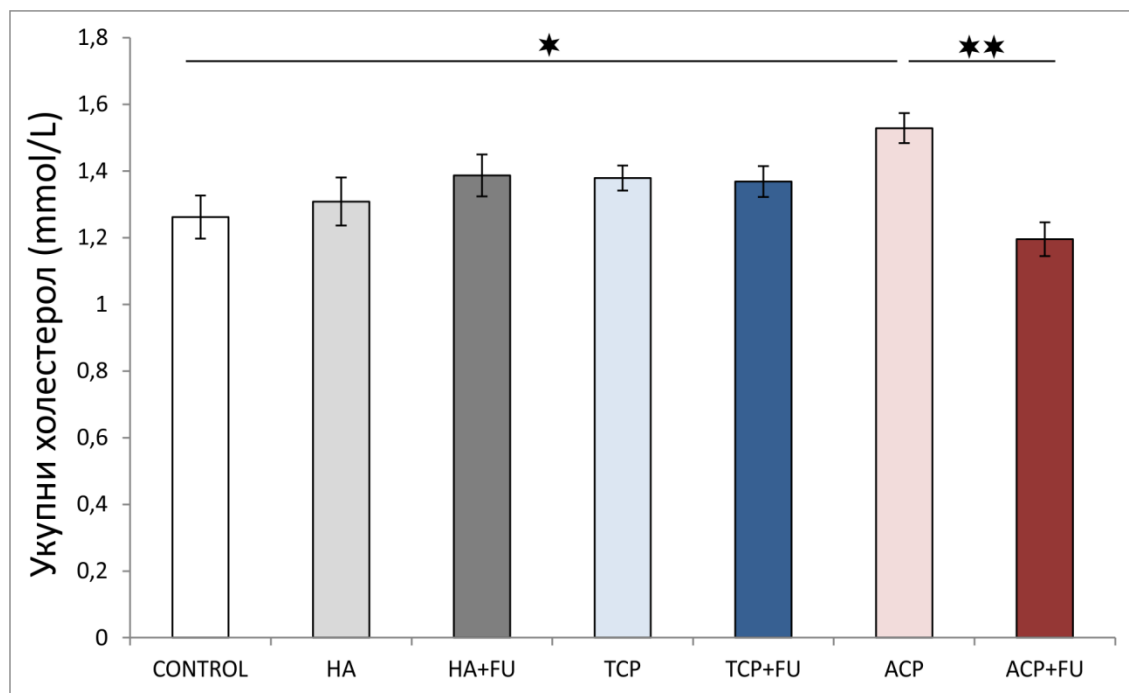
Као што је приказано на Слици 3.3., на нивое HDL-а у серуму није значајно утицао ниједан од примењених форми наночестица CaPs-а ( $F=1.139$ ).



**Слика 3.3. Вредности концентрације HDL холестерола у серуму након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, ACP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, ACP+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као \* $p<0.05$  и \*\* $p<0.01$ .**

#### 4.2.4. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на ниво укупног холестерола у серуму

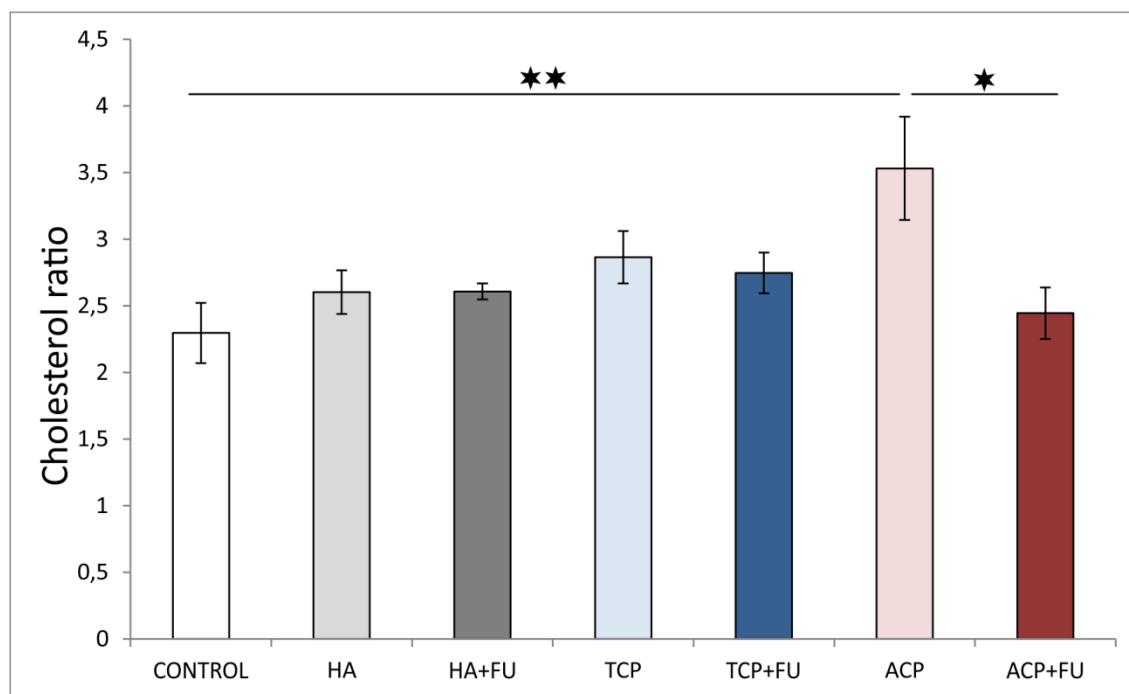
Значајнији утицај након тридесетодневне примене протокола са наночестицама CaPs-а постигнут је на нивоу укупног холестерола (Слика 3.4.,  $F=3.693$ ), где је третман примене АСР-а резултовао значајним повећањем у поређењу са контролном групом ( $p<0.05$ ), али је овај ефекат ослабљен применом екстракта FU који је значајно умањио ниво укупног холестерола у серуму ( $p<0.01$ ) у поређењу са групом у којој је примењиван само АСР. Преостали протоколи наночестица CaPs-а нису значајно променили вредности укупног холестерола у серуму.



**Слика 3.4. Вредности концентрације укупног холестерола у серуму након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, ACP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, ACP+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као \* $p<0.05$  и \*\* $p<0.01$ .**

#### 4.2.5. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на cholesterol ratio у серуму

Најважније промене липидног статуса изазване АСР-ом потврђене су помоћу cholesterol ratio (Слика 3.5.,  $F=3.386$ ) који је такође значајно повећан након третмана честицама АСР-а нано величине у односу на контролну групу ( $p<0.01$ ). Примећено је да је антиоксидантна суплементација екстрактом биљке FU утицала на опадање вредности односа холестерола ( $p<0.05$ ) при чему су вредности сведене на контролне.

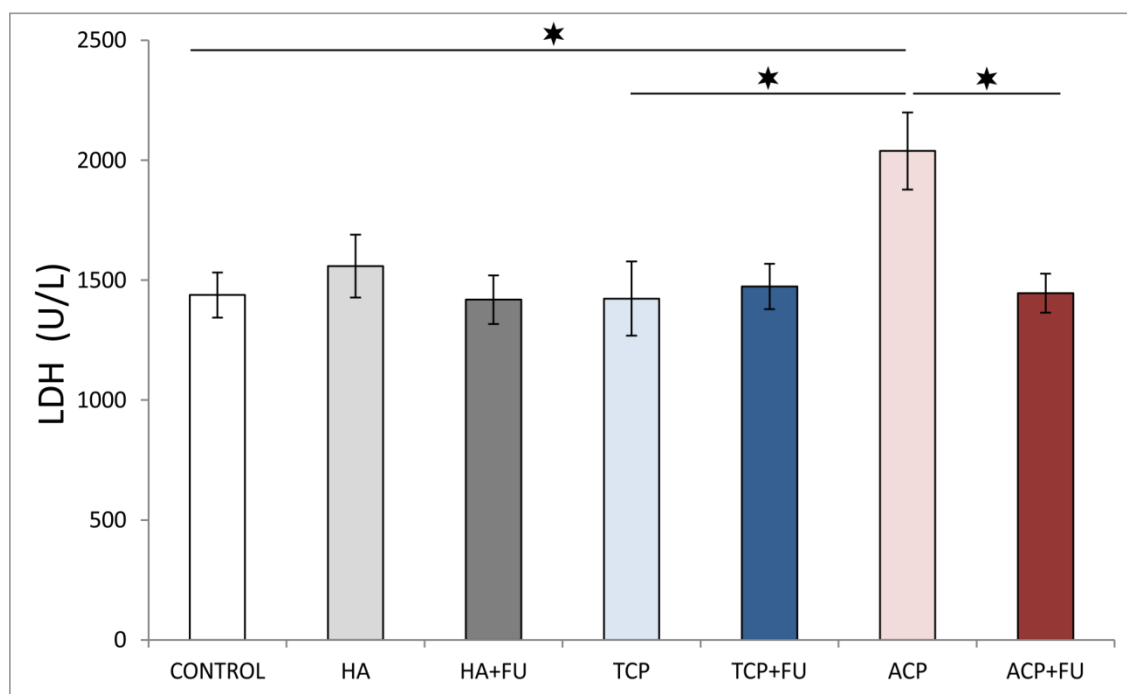


**Слика 3.5. Вредности концентрације односа холестерола у серуму након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, ACP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, ACP+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као \* $p<0.05$  и \*\* $p<0.01$ .**

### 4.3. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на промене нивоа LDH, ALP, ALT, AST, тестостерона и LH у серуму

#### 4.3.1. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на промене нивоа лактат дехидрогеназе у серуму

Серумски нивои LDH-а (Слика 4.1.) били су озбиљно погођени примењеним протоколима ( $F=3.457$ ), што се манифестовало у АСР групи повишењем LDH у поређењу и са контролном и са TCP групом ( $p<0.05$ ). У АСР групи примењен је највећи пораст нивоа LDH у серуму. Међутим, након примене екстракта FU, вредности LDH су враћене на контролне, што је значајно смањило ниво LDH забележен у АСР групи ( $p<0.05$ ). Примена HA и TCP наночестица није изазвала промене нивоа LDH у серуму.

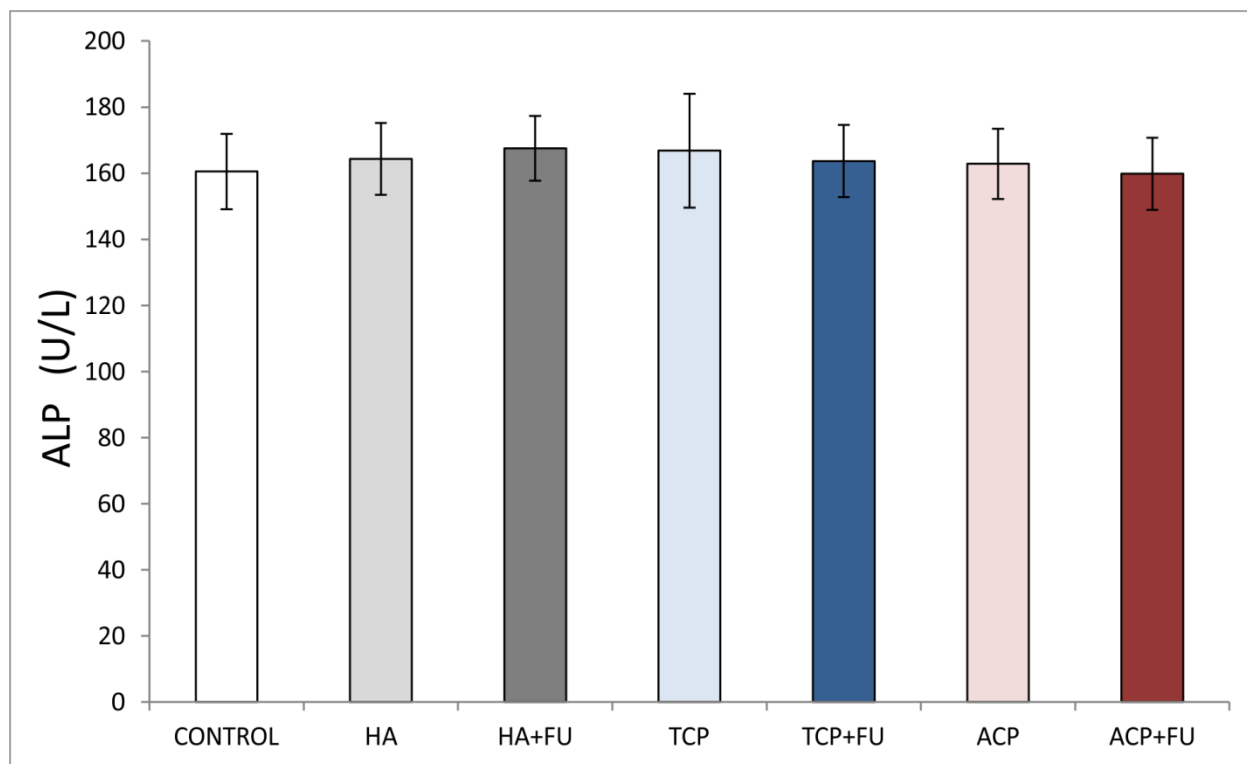


Слика 4.1. Вредности концентрације лактат дехидрогеназе (LDH) у серуму након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, ACP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, ACP+FU – животиње симултано

третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као \* $p < 0.05$  и \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.3.2. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на промене нивоа алкалне фосфатазе у серуму

Процењивањем јетриних ензима, установљено је да примењени протоколи нису значајно утицали на промене серумских вредности ALP-а (Слика 4.2.,  $F=0.059$ ).

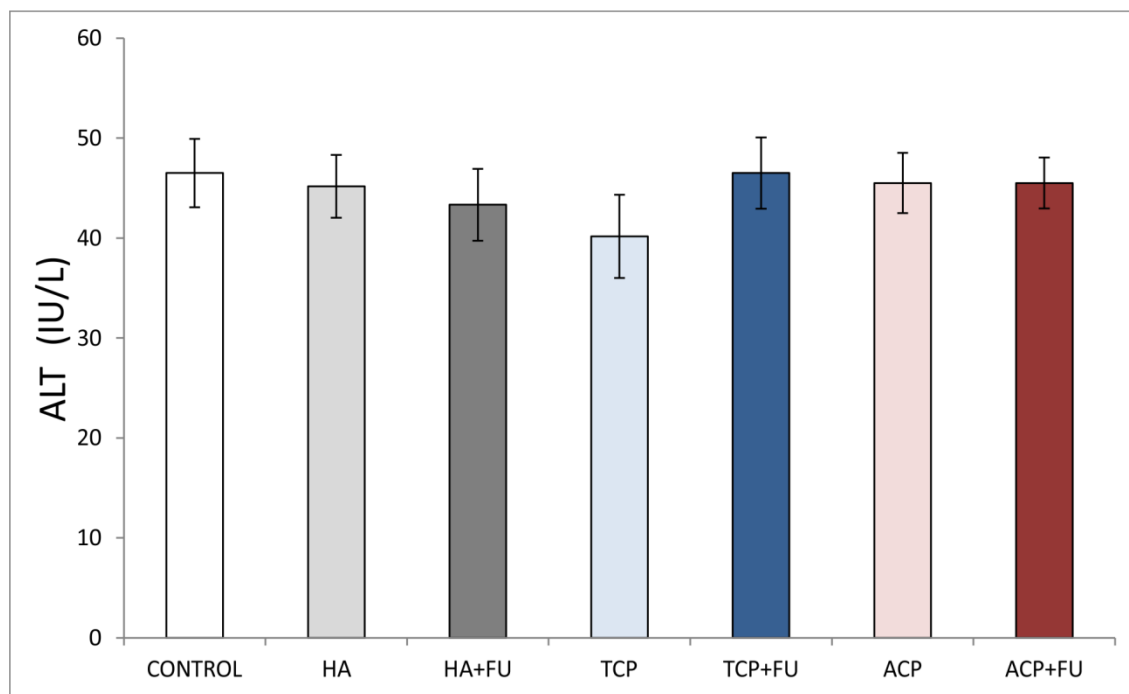


**Слика 4.2.** Вредности концентрације алкалне фосфатазе (ALP) у серуму након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, ACP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, ACP+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом.



### 4.3.3. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на промене нивоа аланин аминотрансферазе у серуму

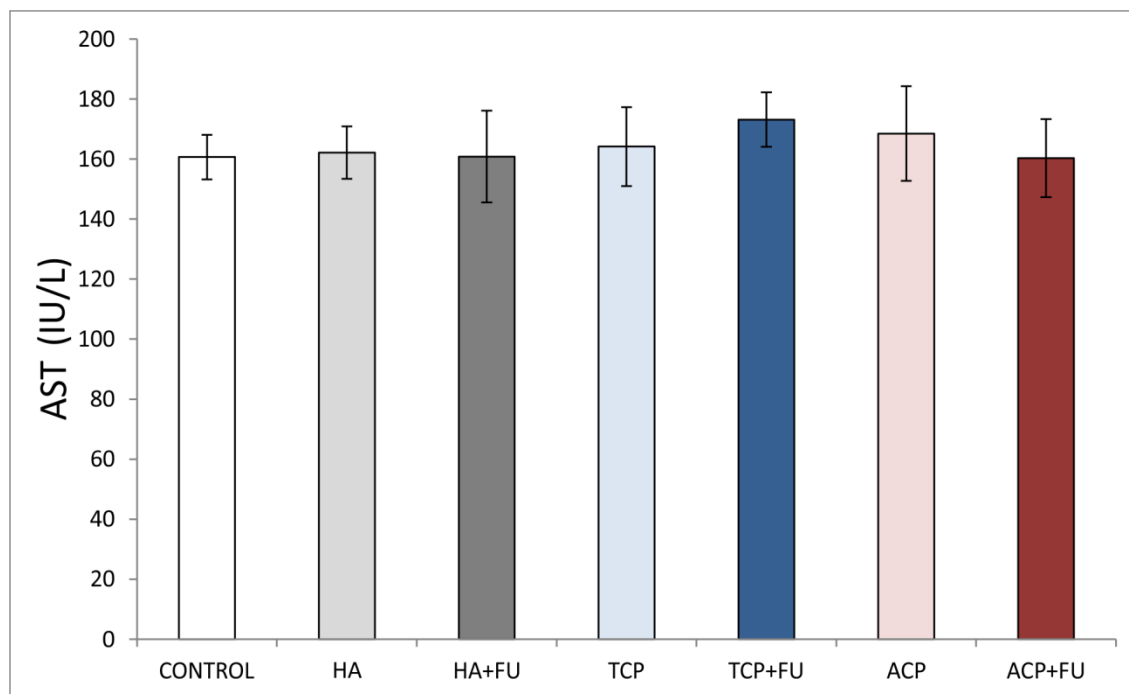
Као што је приказано на Слици 4.3., ниједан од примењених протокола СаPs-а није утицао на промене вредности ALT-а у серуму ( $F= 0.443$ ).



**Слика 4.3. Вредности концентрације аланин аминотрансферазе (ALT) у серуму након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, ACP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, ACP+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом.**

#### 4.3.4. Утицај администрације наночестица калцијум-фосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на промене нивоа аспартат аминотрансферазе у серуму

Серумске вредности АСТ ензима јетре (Слика 4.4.) нису биле значајно измењене, посматрајући било који од примењених протокола ( $F= 0.159$ ).

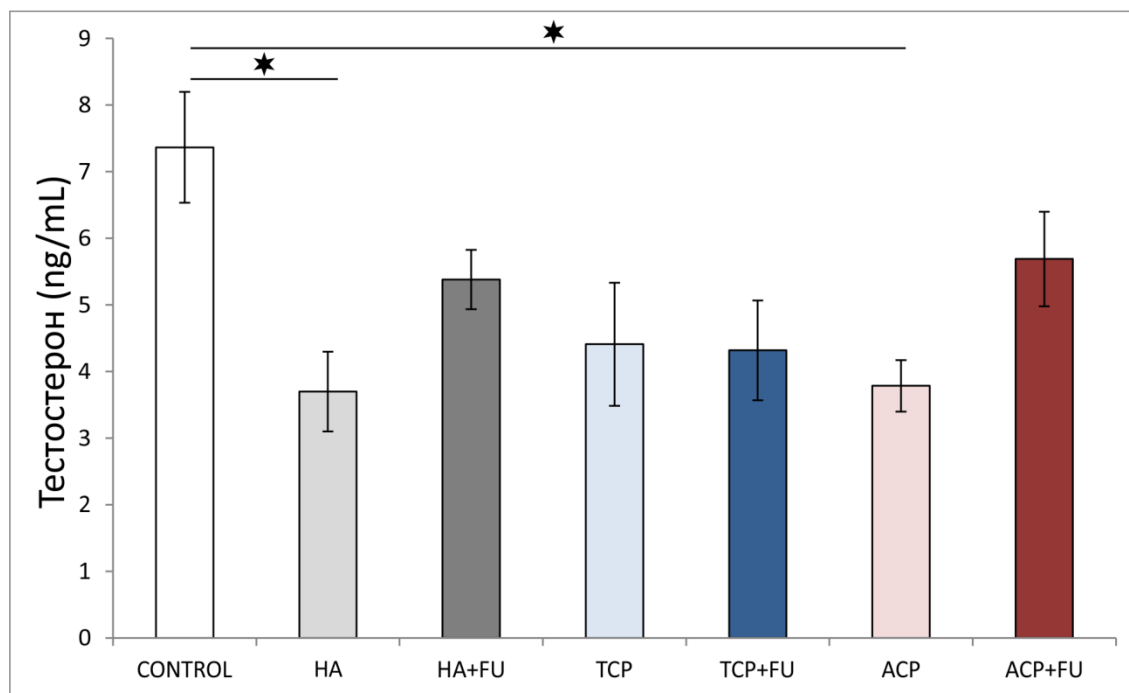


**Слика 4.4. Вредности концентрације аспартат аминотрансферазе (AST) у серуму након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, ACP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, ACP+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом.**

#### 4.3.5. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на промене нивоа тестостерона у серуму

Као што је приказано на слици 4.5., на ниво тестостерона у серуму су значајно утицали протоколи са наночестицама СаPs-а ( $F=3.579$ ).

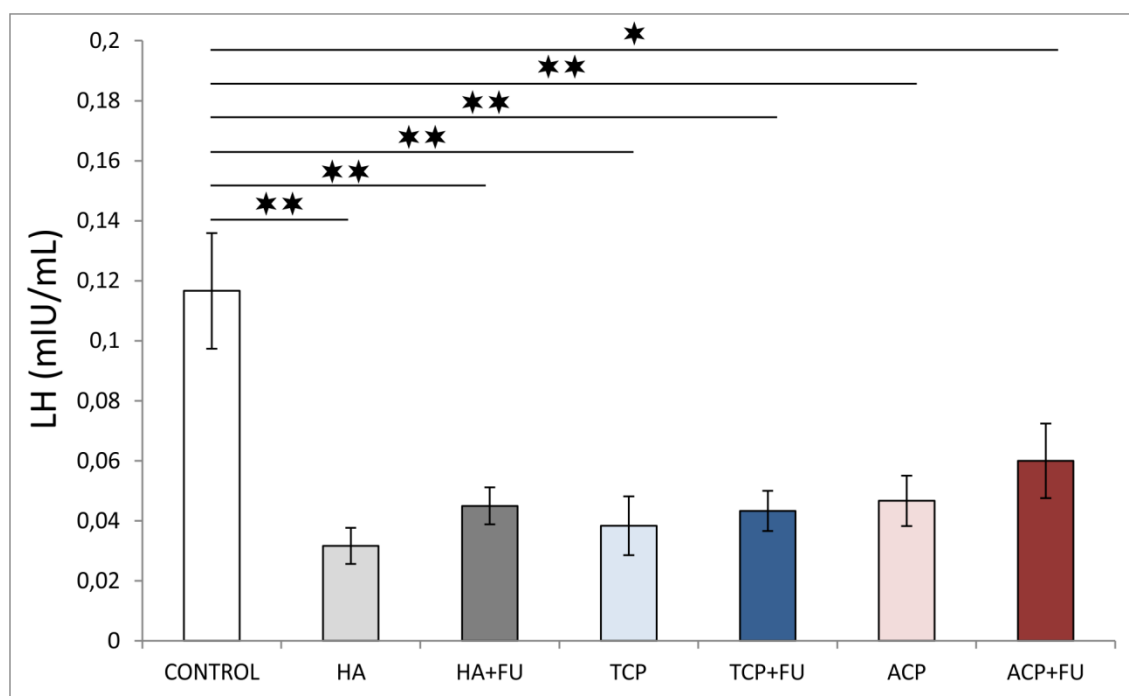
Примећено је да су сви претходно примењени протоколи СаPs-а смањили ниво тестостерона у серуму у поређењу са контролном групом. Међутим, статистички значајно смањење потврђено је тек након третмана са НА и АCP-ом ( $p<0.05$ ). Када се примењује заједно са наночестицама СаPs-а, антиоксидантна суплементација екстрактом биљке FU је спречавала снижавање тестостерона у серуму, мада су вредности остале испод контролних.



**Слика 4.5.** Вредности концентрације тестостерона у серуму након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, НА – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, АCP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, НА+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, АCP+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као  $*p<0.05$ .

#### 4.3.6. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на промене нивоа лутеинизирајућег хормона у серуму

Још значајнији хормонски поремећаји након продуженог уноса наночестица СаPs-а примећени су помоћу нивоа LH у серуму (Слика 4.6.,  $F=7.130$ ). Све три примењене форме наночестица СаPs-а изазвале су значајно смањење серумског LH ( $p<0.01$ ). Примећено је да су вредности LH у серуму биле најниже након примене наночестица HA. Иако је антиоксидантна суплементација екстрактом FU утицала на благи пораст серумских вредности датог параметра, погоршање нивоа LH било је упорно, са вредностима значајно испод контролних ( $p<0.01$  за HA+FU и TCP+FU,  $p<0.05$  за ACP+FU).



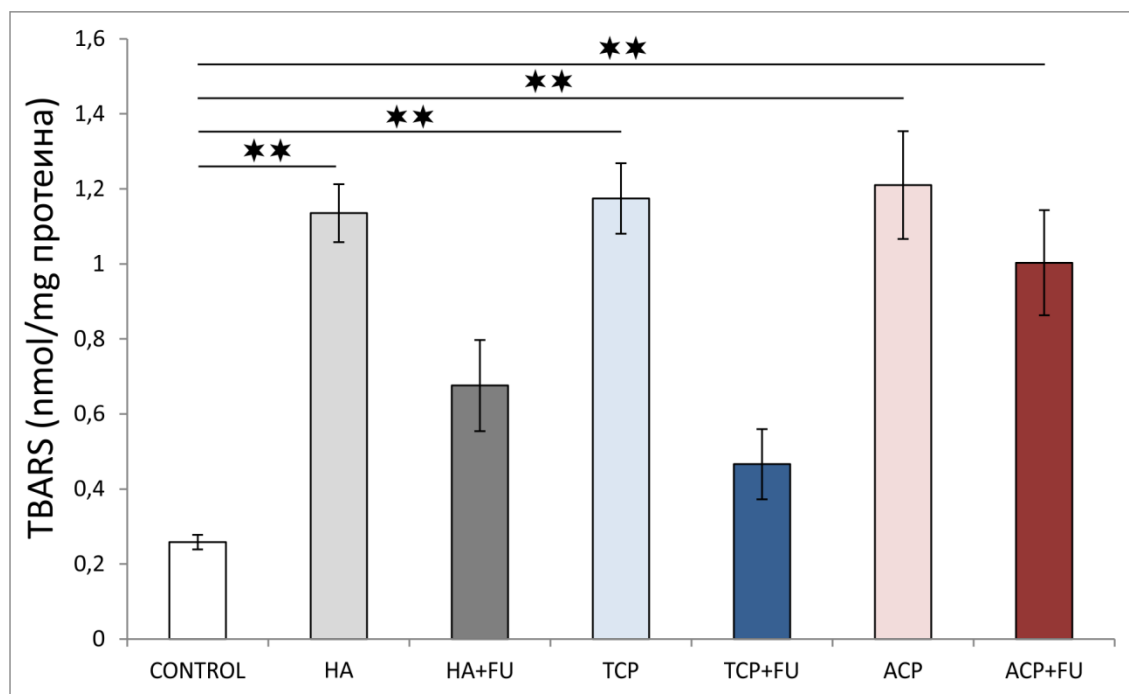
**Слика 4.6. Вредности концентрације лутеинизирајућег хормона (LH) у серуму након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, ACP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, ACP+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као \* $p<0.05$  и \*\* $p<0.01$ .**

#### 4.4. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на маркере оксидативног стреса и апоптотске маркере са репрезентативним Н&Е у бубрегу

##### 4.4.1. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на промене индекса липидне пероксидације у ткиву бубрега

Липидна пероксидација у ткиву бубрега, изражена као TBARS (Слика 5.1.), значајно је промењена након примењених протокола ( $F=12.801$ ).

Вредности TBARS-а биле су значајно изнад контролних вредности ( $p<0.01$ ) у све три групе третиране искључиво наночестицама CaPs-а. Међутим, значајно смањење липидне пероксидације примењено је након истовремене примене екстракта FU у групама третираним HA-ом и TCP-ом, док примена антиоксидантне суплементације није успела да спречи повећање вредности TBARS-а код група које су третиране ACP-ом, јер су вредности остале значајно изнад контроле ( $p<0.01$ ).



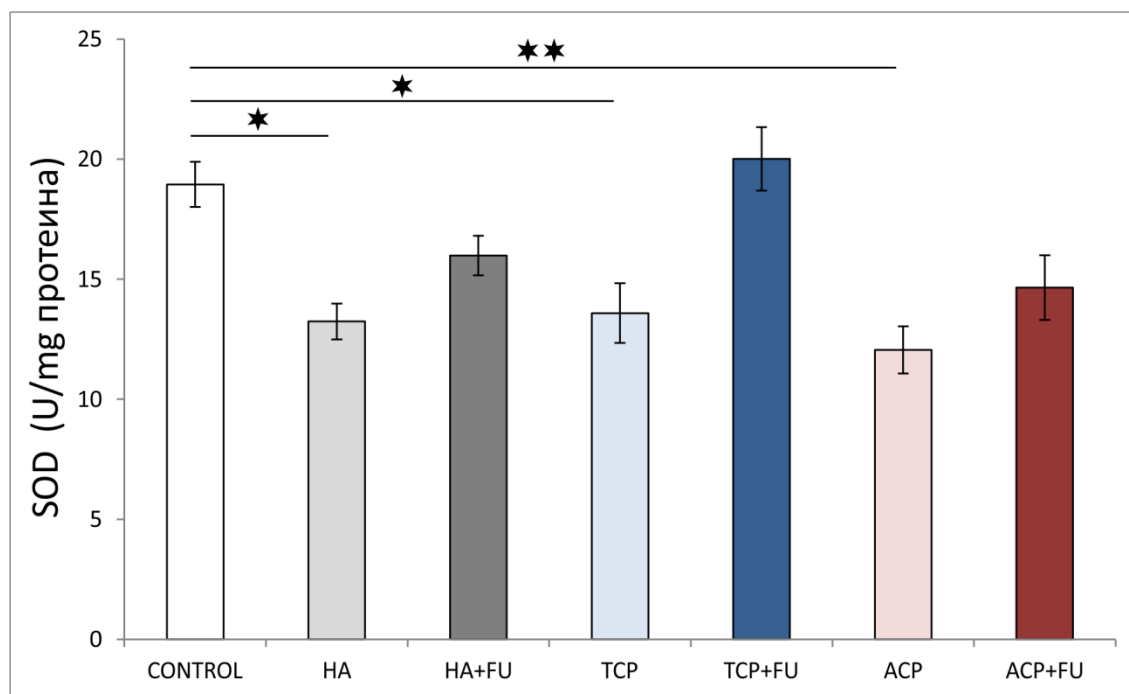
Слика 5.1. Вредности TBARS-а у ткиву бубрега након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, ACP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU

екстрактом, TSP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, ACP+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као  $**p<0.01$ .

#### 4.4.2. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на нивое супероксид дисмутазе у ткиву бубрега

Ензимска антиоксидативна одбрана, детерминисана као активност SOD-а (Слика 5.2.) била је значајно погођена претходно примењеним протоколима ( $F=7.687$ ).

Активност SOD је значајно смањена за све три примењене форме наночестица CaPs-а појединачно ( $p<0.05$  за HA и TCP и  $p<0.01$  за ACP) и поново успостављена истовременом применом антиоксидантне суплементације екстрактом биљке FU.

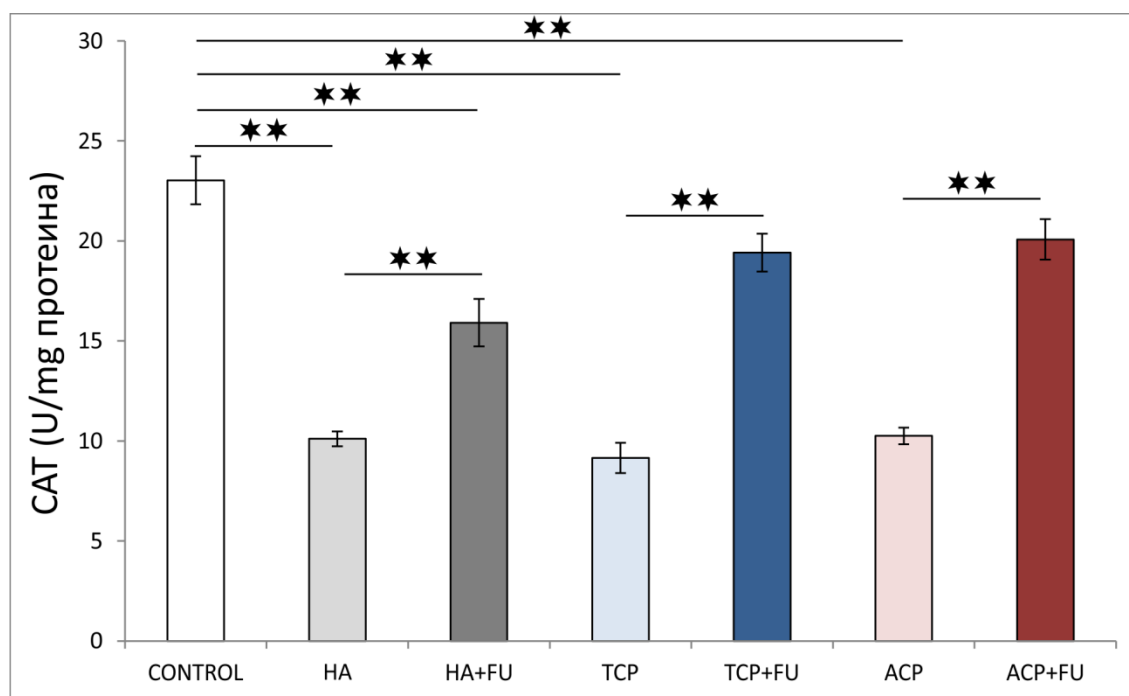


**Слика 5.2. Вредности супероксид дисмутазе (SOD) у ткиву бубрега након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, ACP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, ACP+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као \* $p<0.05$  и \*\* $p<0.01$ .**

#### 4.4.3. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на нивое каталазе у ткиву бубрега

Као што је приказано на слици 5.3., ензимска антиоксидативна одбрана, детерминисана као САТ активност, била је значајно погођена примењеним протоколима ( $F= 39.195$ ).

Значајно смањење САТ активности, постигнуто је са све три форме СаPs-а ( $p<0.01$ ). Међутим, иако је антиоксидантна суплементација екстрактом FU довела до пораста САТ активности ( $p<0.01$ ), вредности су и даље остале значајно испод контролних ( $p<0.01$ ) у све три комбиноване групе.

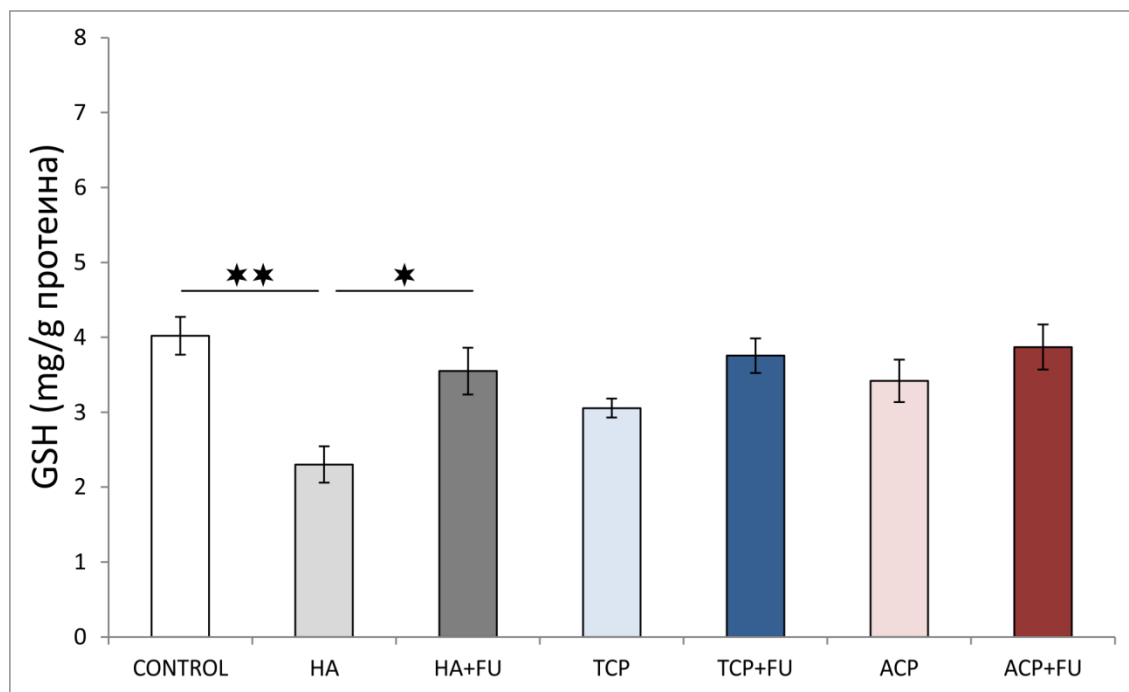


**Слика 5.3. Вредности каталазе (САТ) у ткиву бубрега након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, ACP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, ACP+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као  $**p<0.01$ .**



#### 4.4.4. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на ниво укупног глутатиона у ткиву бубрега

На неензимски антиоксидативни капацитет изражен као GSH (Слика 5.4.) је као и на ензимске механизме, такође значајно утицао примењени третман ( $F=5.248$ ). Значајно смањење нивоа GSH примењено је након примене HA ( $p<0.01$ ), али је успешно компензовано екстрактом FU што је резултирало значајним повећањем концентрације GSH у бубрежном ткиву ( $p<0.05$ ). Иако је примена TCP-а и ACP-а довела до смањења вредности GSH-а, овај резултат није статистички потврђен.

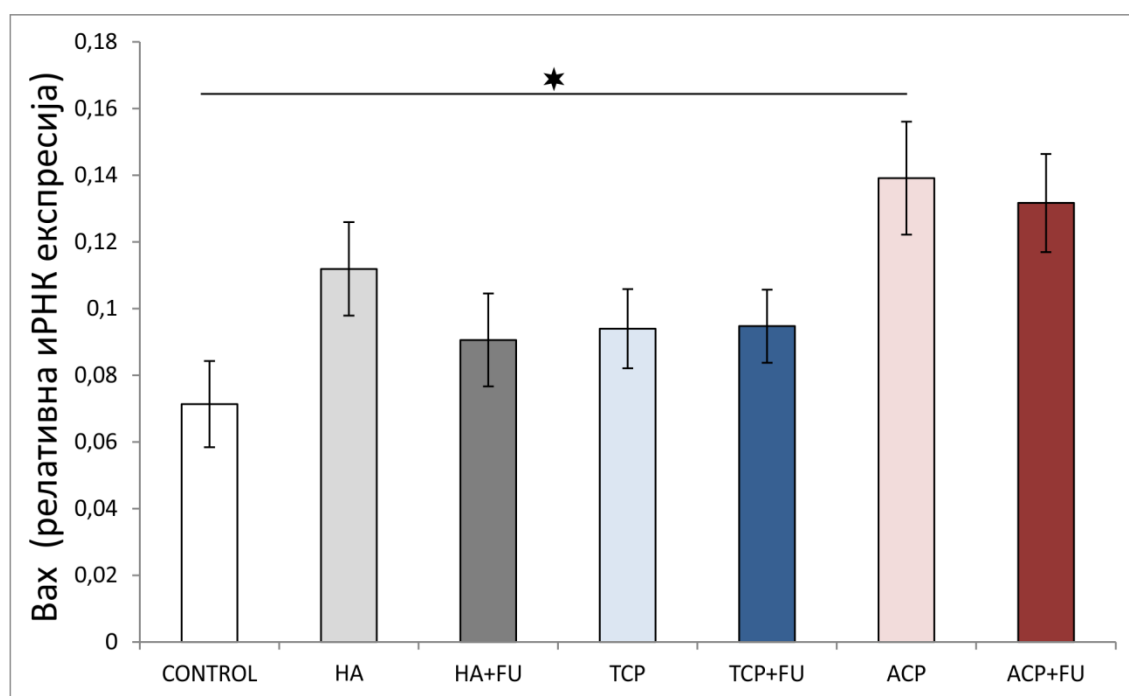


**Слика 5.4.** Вредности укупног глутатиона (GSH) у ткиву бубрега након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, ACP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, ACP+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као \* $p<0.05$  и \*\* $p<0.01$ .

#### 4.4.5. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на релативну генску експресију проапоптотског гена – Вах у ткиву бубрега повезаних са апоптозом

Релативна експресија гена проапоптотског Вах маркера у ткиву бубрега значајно је промењена након примењених протокола СаPs-а (Слика 5.5.,  $F=3.081$ ).

У поређењу са контролним вредностима, хронични третман наночестицама АСР узоковао је повећање релативне mRNA експресије Вах-а у АСР групи ( $p<0.05$ ). Иако статистички није доказано, НА и TCP група су довеле до пораста вредности релативне генске експресије за Вах. Применом екстракта FU је претходно повећана експресија смањена али се вредности нису вратиле до контролних.

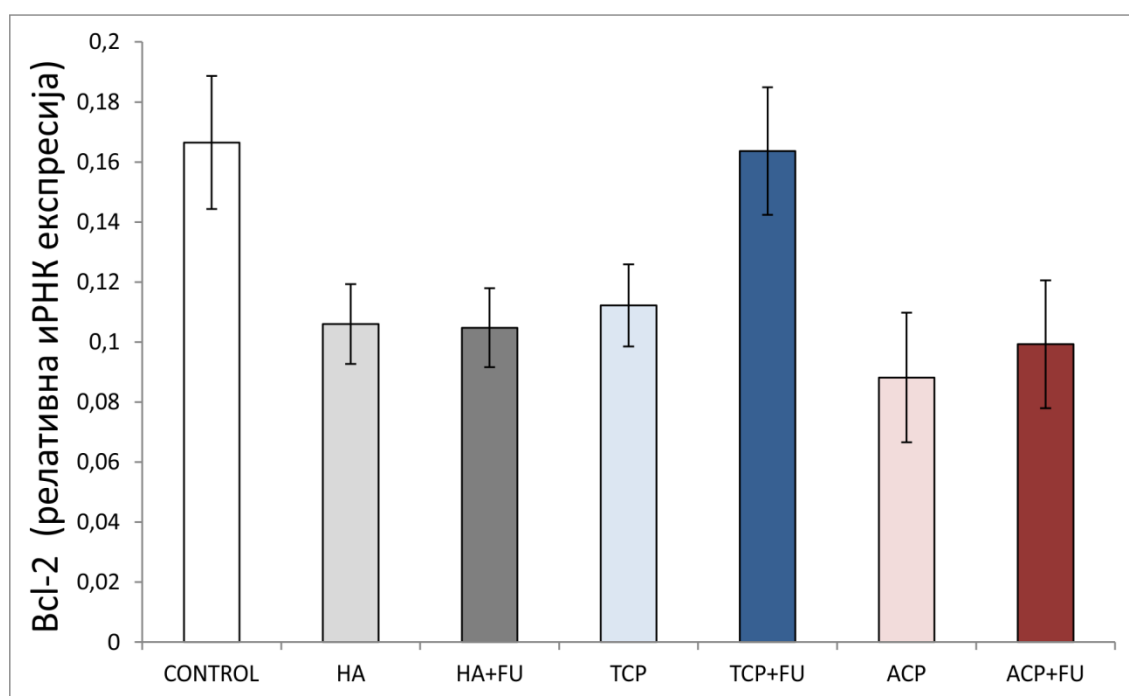


**Слика 5.5. Промене релативне генске експресије mRNA за Вах у ткиву бубрега након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, НА – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, АСР – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, НА+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, АСР+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као  $*p<0.05$ .**

#### 4.4.6. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на релативну генску експресију антиапоптозног гена – Bcl-2 у ткиву бубрега повезаних са апоптозом

Релативна генска експресија mRNA за Bcl-2 у ткиву бубрега није значајно промењена примењеним протоколима студије ( $F= 2.919$ ).

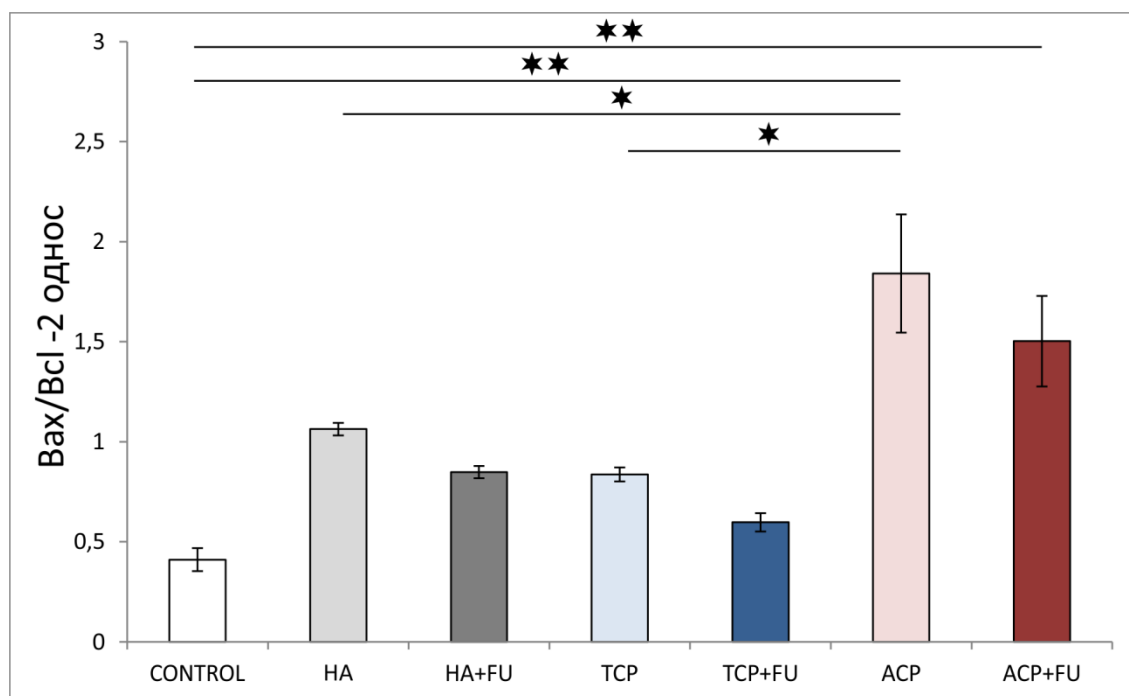
Као што је приказано на Слици 5.6., у групама које су примиле самостално наночестице HA, ACP и TCP, иако је дошло до смањења у односу на контролну групу, промене нису статистички доказане. Такође, ни комбиноване групе наночестица са екстрактом биљке FU нису значајно промениле вредности релативне генске експресије mRNA за Bcl-2 у ткиву бубрега.



**Слика 5.6. Промене релативне генске експресије mRNA за Bcl-2 у ткиву бубрега након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, ACP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, ACP+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом.**

#### 4.4.7. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на промене релативне генске експресије односа проапоптотских и антиапоптотских гена (*Bax/Bcl-2*) у ткиву бубрега повезаних са апоптозом

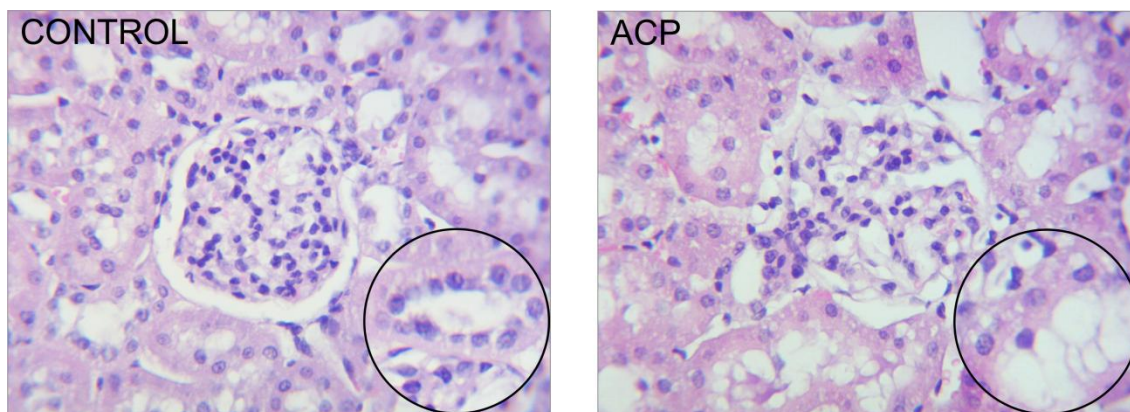
Однос однос експресије про- и анти- апоптотских гена, наночестице CaPs-а значајно су помериле однос на страну про-апоптототских гена (Слика 5.7.,  $F= 12.099$ ). Иако је овај однос примећен код све три примењене форме наночестица CaPs-а, значајно повећање постигнуто је само у АСР групи. Осим повећања у поређењу са контролним вредностима ( $p<0.01$ ), примена АСР-а довела је до повећања односа *Bax/Bcl-2* чак и у поређењу са друге две групе коришћене у овој студији ( $p<0.05$ ). Примена екстракта FU ублажила је промењене вредности у све три групе у којима су наночестице индивидуално примењене али је статистичка значајност уочена једино у АСР+FU групи ( $p<0.01$ ).



**Слика 5.7. Промене релативне генске експресије проапоптотских и антиапоптотских гена (однос *Bax/Bcl-2*) у ткиву бубрега након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, АСР – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, АСР+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као \* $p<0.05$  и \*\* $p<0.01$ .**

#### 4.4.8. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на патохистолошке промене у ткиву бубрега

Хронична примена наночестица калцијумфосфата је доводила до приметних хистолошких промена у ткиву бубрега. Симултана примена антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* је поменуте промене чинила дискретнијим. Запажени резултати били су у складу са патохистолошким налазима вакуолизације епителних ћелија проксималног вијугавог тубула и ћелија гломерула која је била најистакнутија у АСР групи (Слика 5.8.).



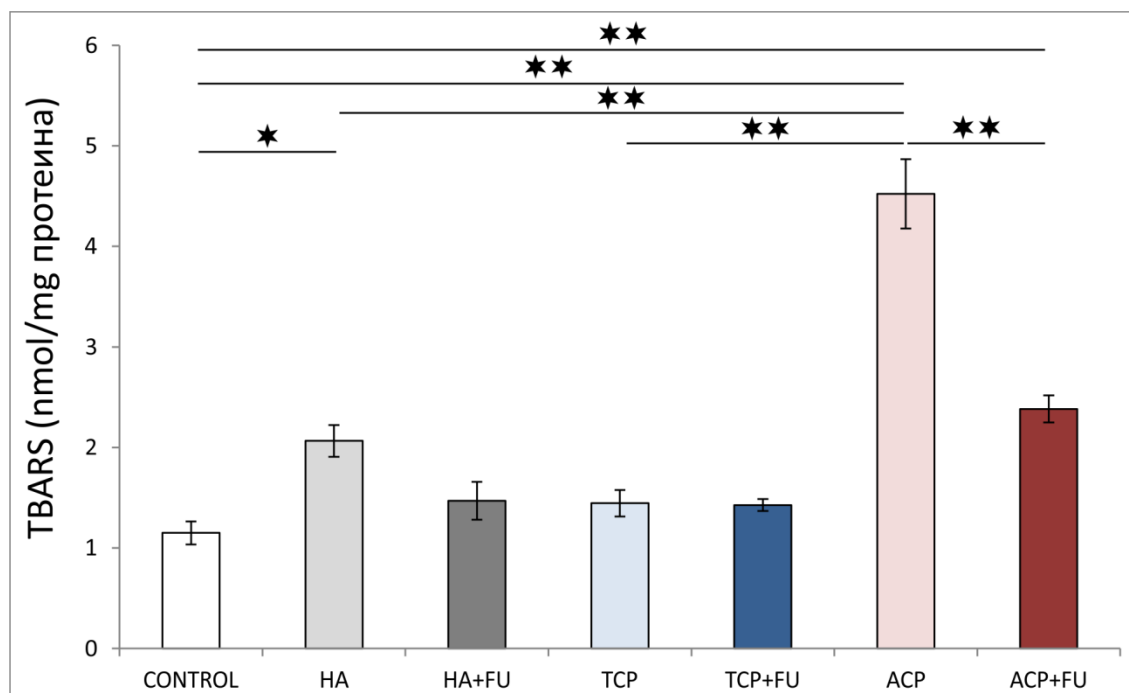
**Слика 5.8.** Патохистолошке промене у ткиву бубрега (репрезентативне фотомикрографије) након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria*. CONTROL – животиње из контролне групе, АСР – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом.

## 4.5. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на маркере оксидативног стреса и апоптотске маркере са репрезентативним Н&Е у јетри

### 4.5.1. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на промене индекса липидне пероксидације у ткиву јетре

Као што је приказано на Слици 6.1., примењени протоколи наночестица CaPs-а показали су значајан утицај на липидну пероксидацију, изражену кроз TBARS (F=40.750) у јетри.

Иако примена TCP-а није произвела значајну промену TBARS-а, орални унос НА изазвао је значајно повећање у поређењу са контролним вредностима ( $p < 0.05$ ). Међутим, најистакнутији пораст липидне пероксидације примећен је након примене АСР-а. Вредности TBARS-а код животиња које су третиране искључиво АСР-ом биле су значајно изнад контролних ( $p < 0.01$ ), па чак и у поређењу са НА и TCP групом ( $p < 0.01$ ). Иако је суплементација FU екстрактом значајно смањила липидну пероксидацију изазвану АСР-ом ( $p < 0.01$ ), вредности су остале значајно изнад контролних ( $p < 0.01$ ).



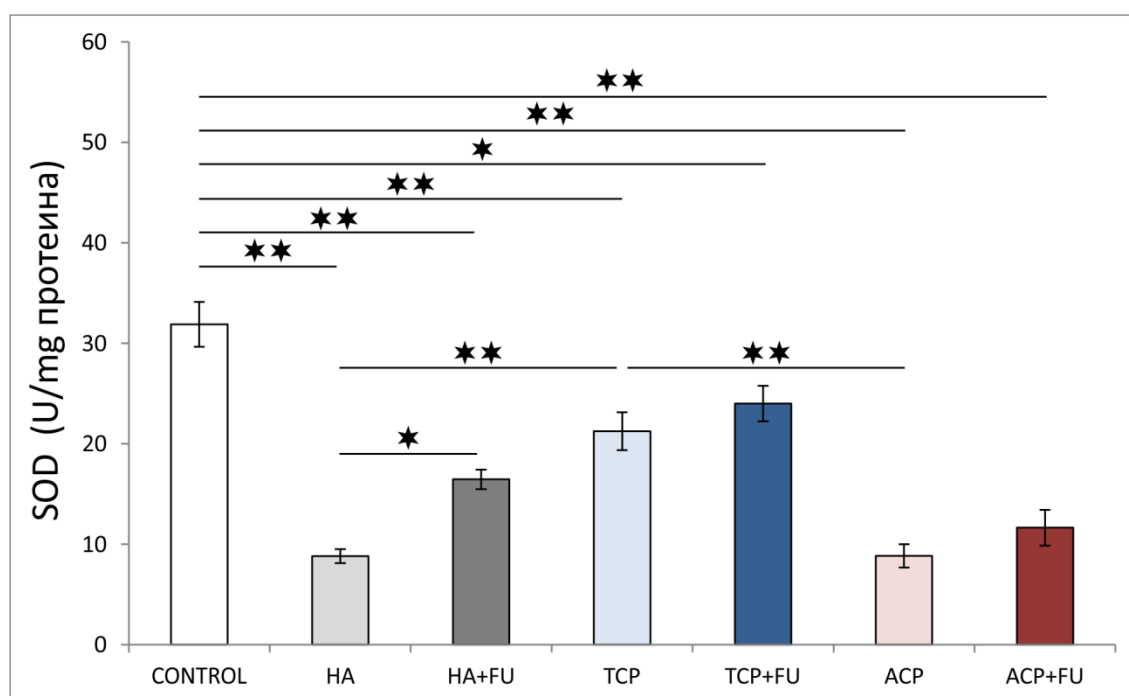
Слика 6.1. Вредности TBARS-а у ткиву јетре након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, НА – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње

третиране трикалцијум фосфат хидратом, АСР – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, НА+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, ТСР+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, АСР+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као \* $p < 0.05$  и \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.5.2. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на промене нивоа супероксид дисмутазе (SOD) у ткиву јетре

Активност SOD антиоксидативног ензима (Слика 6.2.) значајно је промењена примењеним протоколима ( $F=29.663$ ).

Све три групе третиране наночестицама CaPs-а значајно су редуковале активност SOD у поређењу са контролним вредностима ( $p<0.01$ ). Занимљиво је да је пад активности SOD уочен у HA и ACP групи био још израженији у поређењу са TCP групом ( $p<0.01$ ). Иако је антиоксидантна суплементација резултирала повећањем активности ензима (значајно за SOD у HA+FU групи,  $p<0.05$ ), вредности у свим комбинованим групама остале су значајно испод контроле ( $p<0.01$ ).



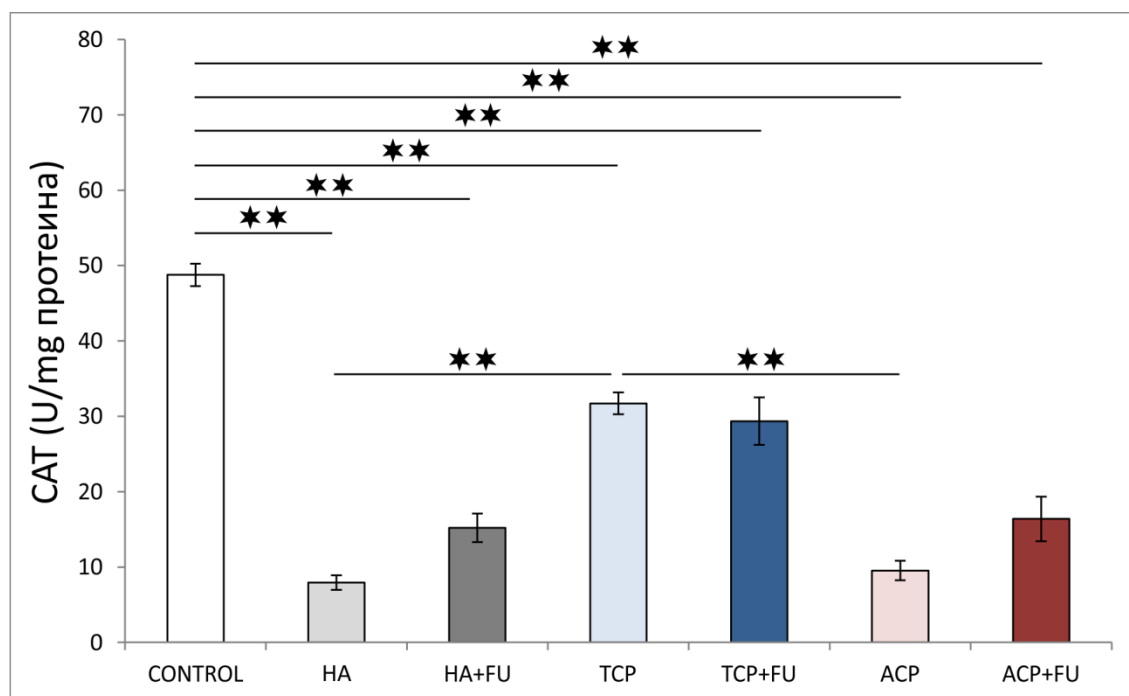
**Слика 6.2. Вредности супероксид дисмутазе (SOD) у ткиву јетре након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, ACP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, ACP+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као \* $p<0.05$  и \*\* $p<0.01$ .**



#### 4.5.3. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на промене нивоа каталазе у ткиву јетре

Активност САТ антиоксидативног ензима такође је значајно промењена примењеним протоколима (Слика 6.3.,  $F= 51.663$ ).

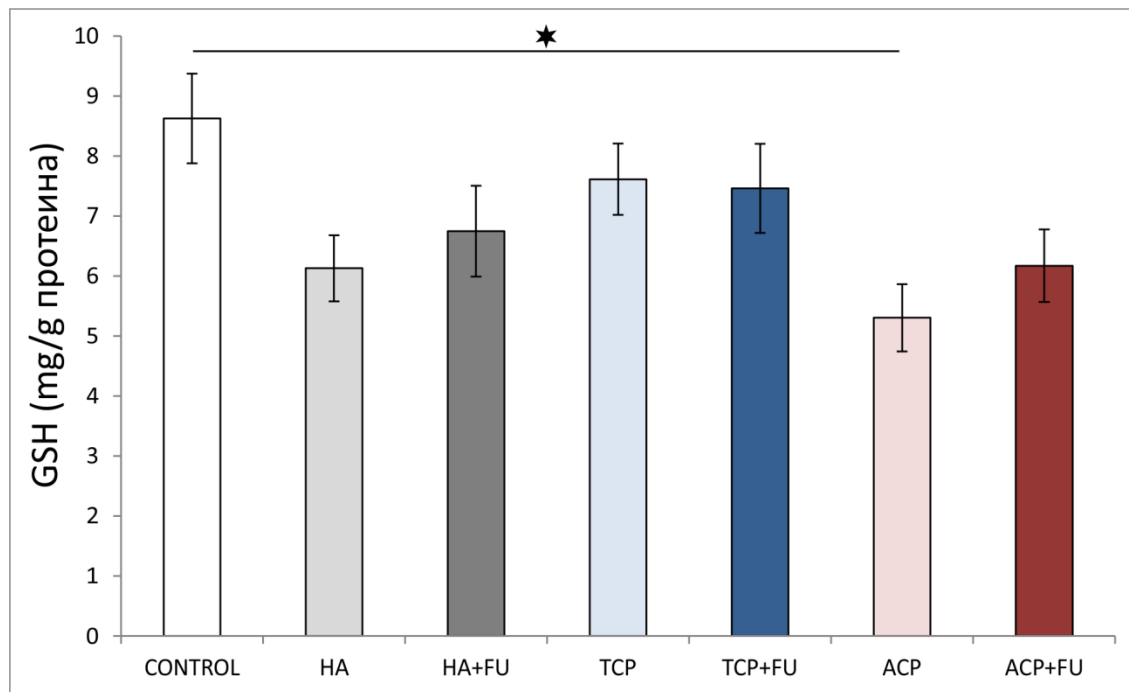
Све три групе у којима су наночестице СаPs-а индивидуално примењене значајно су редуковале активност САТ у поређењу са контролним вредностима ( $p<0.01$ ). Пад активности САТ уочен је у НА и АСР групи био је веома изражен у односу на вредности из контролне групе, међутим, пад је био значајно израженији у поређењу са ТСП групом ( $p<0.01$ ). Иако је антиоксидантна суплементација резултирала повећањем активности ензима у свим групама изузев ТСП групе где је примењено благо снижење, вредности у свим комбинованим групама остале су значајно испод контроле ( $p<0.01$ ).



**Слика 6.3. Вредности каталазе (САТ) у ткиву јетре након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, НА – животиње третиране хидроксиапатитом, ТСП – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, АСР – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, НА+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, ТСП+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, АСР+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као  $**p<0.01$ .**

#### 4.5.4. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на ниво глутатиона у ткиву јетре

Неензимски антиоксидативни капацитет у јетри изражен као GSH (Слика 6.4.), био је мање погођен од ензимског ( $F=2.889$ ), јер је само појединачна примена АСР-а резултирала значајним падом ( $p<0.05$ ), што је такође преокренуто додавањем екстракта FU.

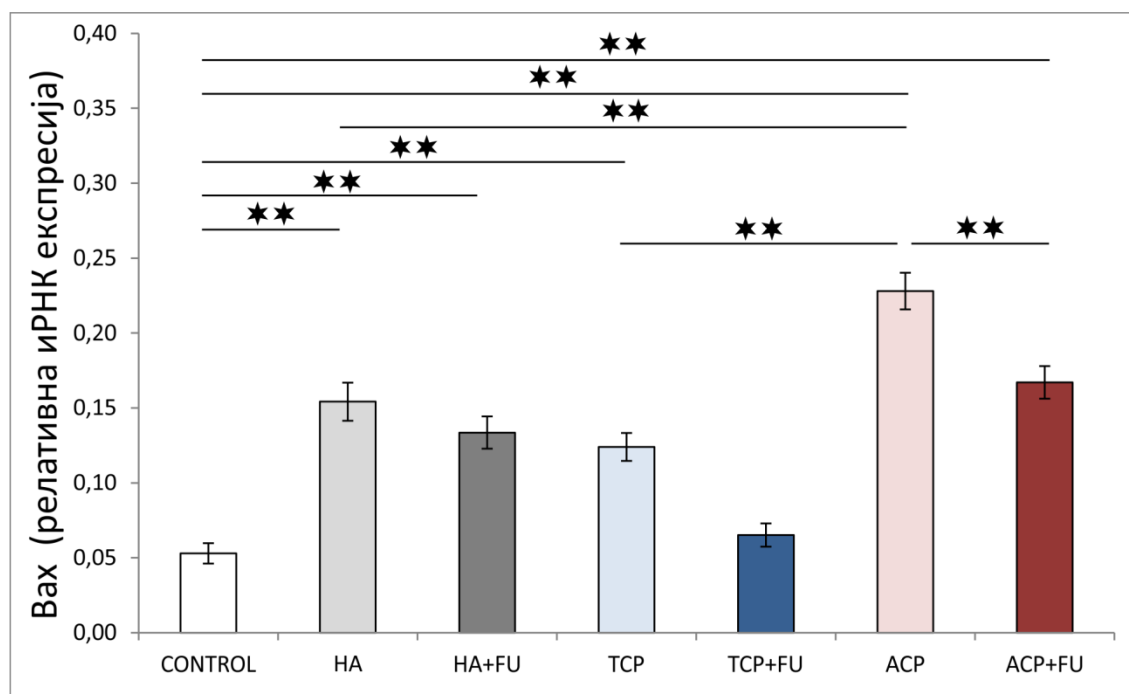


**Слика 6.4. Вредности глутатиона (GSH) у ткиву јетре након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, ACP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, ACP+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као  $*p<0.05$ .**

#### 4.5.5. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на релативну генску експресију проапоптотског гена – Вах у ткиву јетре повезаних са апоптозом

Анализом релативне генске експресије апоптотских маркера откривен је веома снажан утицај примене наночестица СаPs-а на про-апоптотске – Вах гене (Слика 6.5.,  $F=34.431$ ).

Када су појединачно примењене, све три форме наночестица СаPs-а укључене у овој студији значајно су повећавале релативну експресију Вах-а ( $p<0.01$ ), са најистакнутијим про-апоптотским деловањем у АСР групи. Такође, у АСР групи су вредности биле значајно изнад вредности у НА и ТСП групи ( $p<0.01$ ). Антиоксидантна суплементација екстрактом FU, који је значајно смањио релативну експресију Вах-а у комбинованој групи АСР+FU ( $p<0.01$ ), није била довољна да спречи повећање Вах-а, изузев у ТСП+FU комбинованој групи.



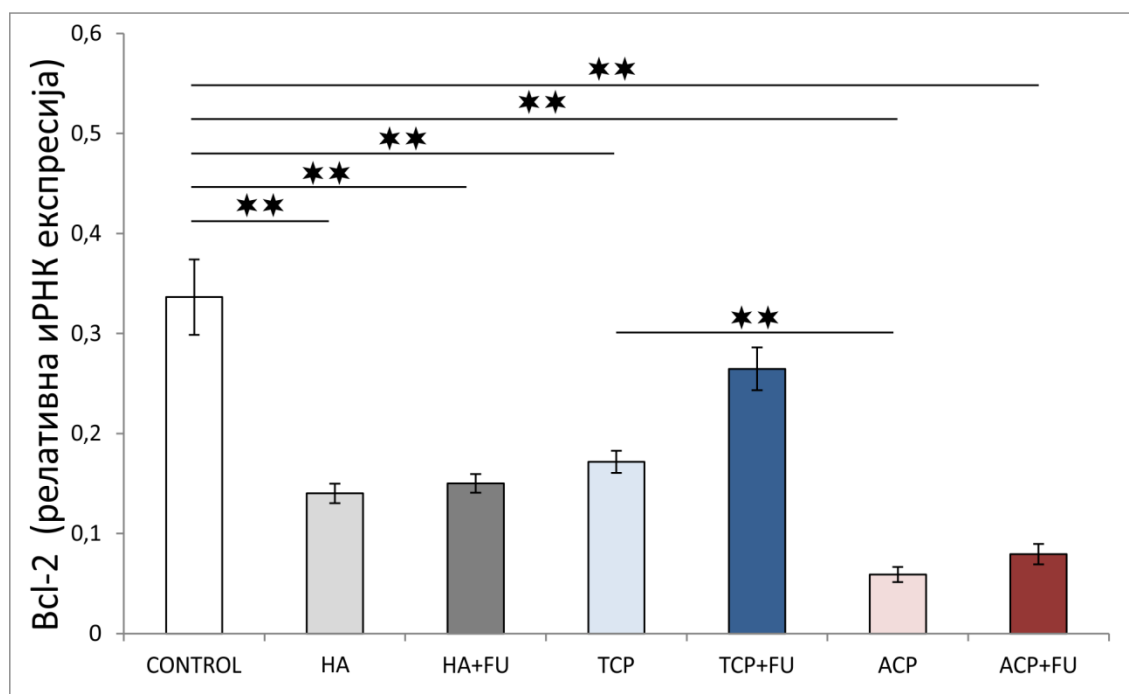
**Слика 6.5.** Промене релативне генске експресије mRNA за Вах у ткиву јетре након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, НА – животиње третиране хидроксиапатитом, ТСП – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, АСР – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, НА+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, ТСП+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, АСР+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као

\*\*p<0.01.

#### 4.5.6. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на промене релативне генске експресије mRNA за Bcl-2 у ткиву јетре повезаних са апоптозом

Наночестице CaPs-а су веома снажно утицале на анти-апоптотске – Bcl-2 (Слика 6.6.,  $F=29.141$ ) гене.

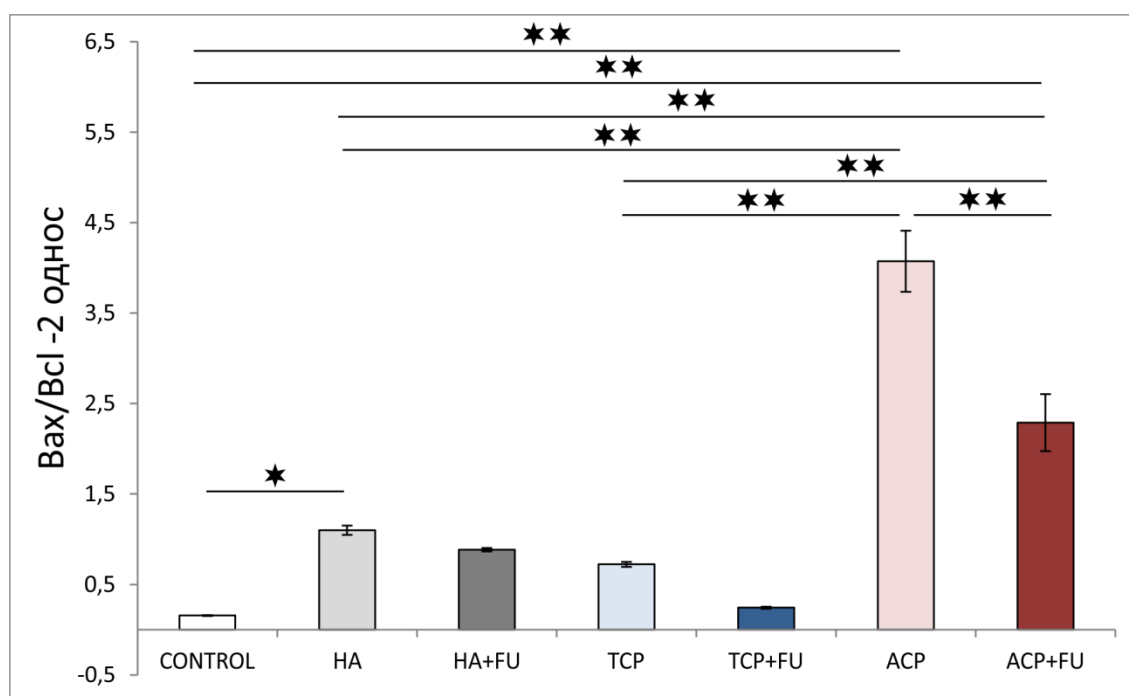
Испитивања са појединачно примењеним формама наночестица CaPs-а значајно су смањила релативну експресију гена Bcl-2 у поређењу са контролном групом ( $p<0.01$ ). Опет, најистакнутија промена је примећена у ACP групи, где је погоршање експресије Bcl-2 било значајно чак и у поређењу са TCP групом ( $p<0.01$ ). Као и за Вах, антиоксидантна суплементација екстрактом биљке успешно је спречила опадање овог анти-апоптотског маркера само у TCP+FU комбинованој групи.



**Слика 6.6. Промене релативне генске експресије mRNA за Bcl-2 у ткиву јетре након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, ACP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, ACP+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као  $**p<0.01$ .**

4.5.7. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на релативну генску експресију проапоптотских и антиапоптотских гена – однос Вах/Всl-2 у ткиву јетре повезаних са апоптозом

Анализом релативне генске експресије апоптотских маркера откривен је веома снажан утицај примене наночестица СаPs-а на однос про-апоптотских – Вах/ анти-апоптотских Всl-2 гена (Слика 6.7., F=62.482). Као што је приказано на слици 6.7., однос Вах/Всl-2 потврдио је про-апоптотски ефекат код индивидуално примењених наночестица СаPs-а у поређењу са контролом (p<0.05 за НА и p<0.01 за АСР), изузев у ТСР групи где није уочена статистички значајна разлика иако је дошло до пораста вредности у односу на контролне. Про-апоптотско деловање поново је било најистакнутије у АСР групи, са вредностима односа Вах/Всl-2 значајно изнад друге две индивидуално примењене групе наночестица СаPs-а (p<0.01). За разлику од НА и ТСР, истовремена примена екстракта FU у примењеној одговарајућој дози, иако је смањила однос (p<0.01), није успела да спречи АСР-ом изазвано про-апоптотско деловање (p<0.01).

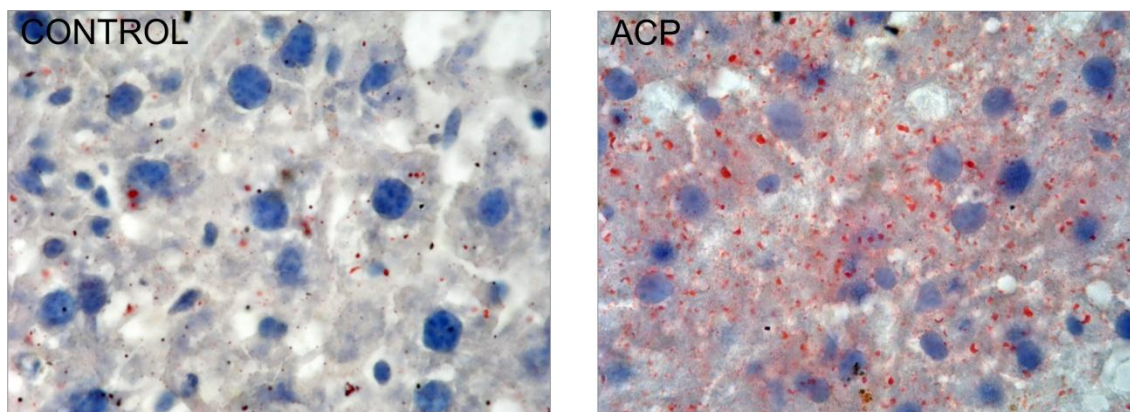


**Слика 6.7.** Промене релативне генске експресије mRNA (однос Вах/Всl-2) у ткиву јетре након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, НА – животиње третиране хидроксиапатитом, ТСР – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, АСР – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, НА+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, ТСР+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, АСР+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су

представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као \* $p < 0.05$  и \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.5.8. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на патохистолошке промене у ткиву јетре

Једномесечна администрација наночестица калцијумфосфата је за последицу имала манифестне хистолошке промена у ткиву јетре, при чему је симултана примена антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* ублажавала уочене промене. Патохистолошка анализа акумулације липида у ткиву јетре, обојеним Oil-Red-O техником, показала је интрацелуларну микровезикуларну стеатозу која је била најистакнутија у АСР групи (Слика 6.8.).



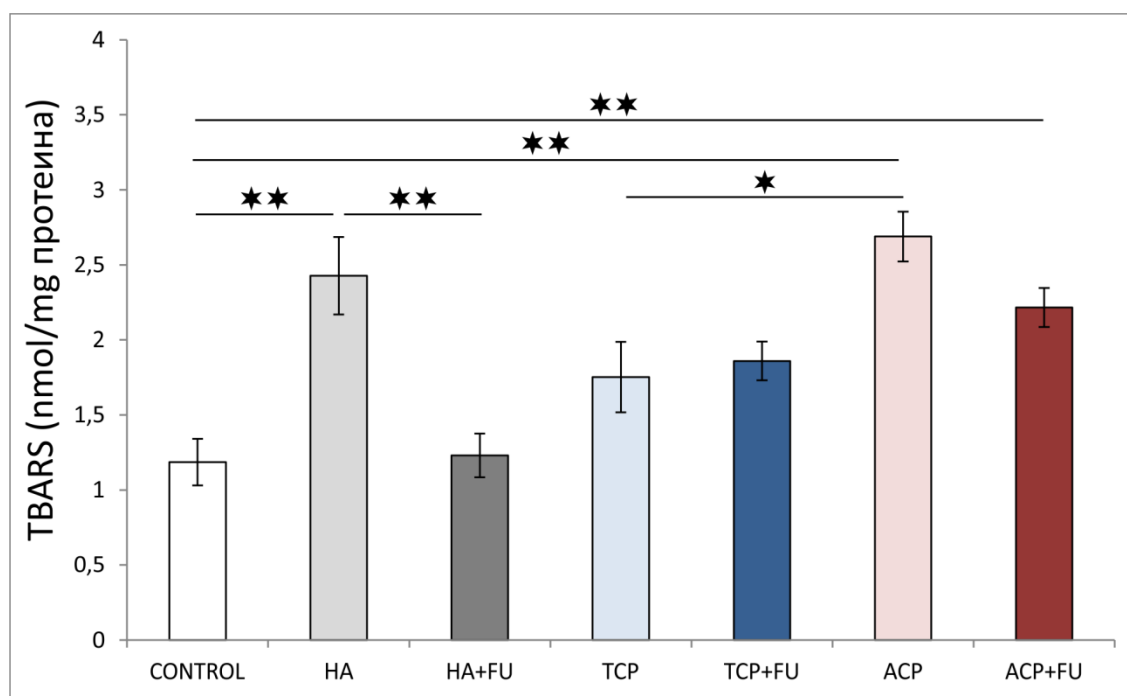
**Слика 6.8.** Патохистолошке промене у ткиву јетре (репрезентативне фотомикрографије) након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria*. CONTROL – животиње из контролне групе, АСР – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом.



## 4.6. Утицај администрације наночестица калцијум-фосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на маркере оксидативног стреса и апоптотске маркере са репрезентативним Н&Е у тестису

### 4.6.1. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на промене индекса липидне пероксидације у ткиву тестиса

Сви примењени протоколи наночестица СаPs-а у овој студији значајно су утицали на оксидативни статус у ткиву тестиса пацова помоћу липидне пероксидације (TBARS, Слика 7.1.,  $F=10.130$ ). Примена НА и АСР повећала је вредности TBARS-а у поређењу са контролом ( $p<0.01$ ), па чак и у поређењу са TCP групом ( $p<0.01$ ) за животиње третиране АСР-ом, при чему је пораст изазван у НА и АСР био израженији у односу на TCP групу. Док је комбинована примена антиоксидантне суплементације и НА резултирала значајним падом липидне пероксидације у поређењу са индивидуално примењеним НА ( $p<0.01$ ) и вратила вредности TBARS-а на контролне нивое, екстракт FU није значајно утицао на повећање TBARS-а изазвано АСР-ом, а вредности су остале значајно изнад контролних ( $p<0.01$ ).

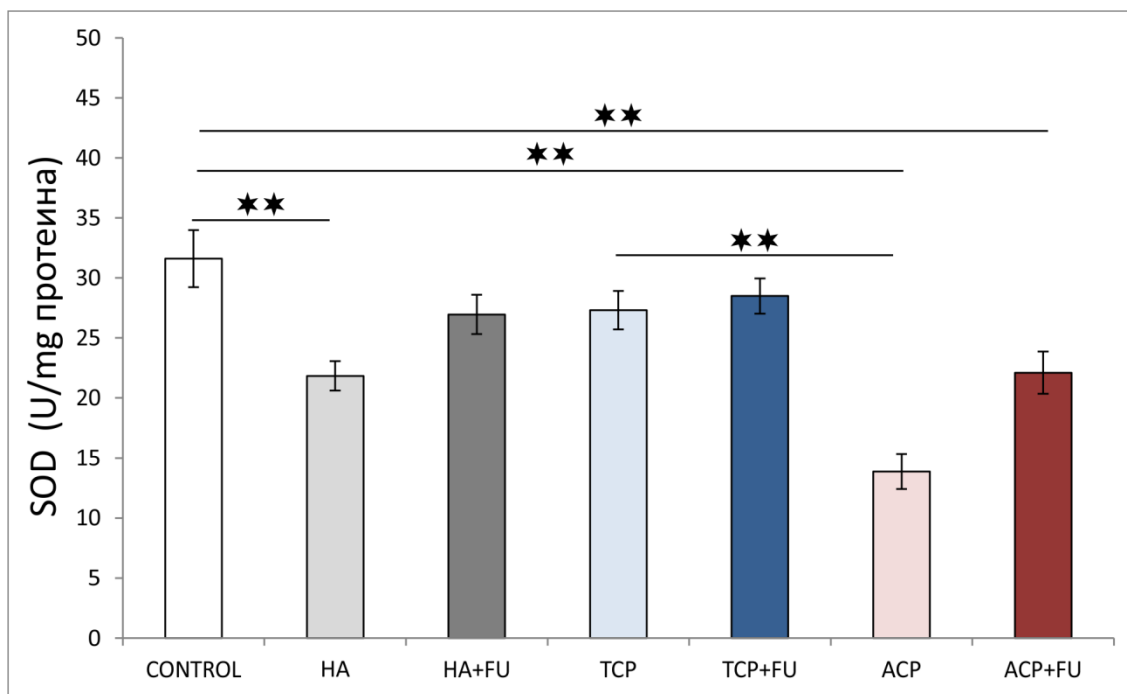


Слика 7.1. Вредности TBARS-а у ткиву тестиса након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, НА – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње

третиране трикалцијум фосфат хидратом, АСР – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, НА+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, ТСР+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, АСР+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као \* $p < 0.05$  и \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.6.2. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на промене нивоа супероксид дисмутазе у ткиву тестиса

Активност SOD антиоксидативног ензима (Слика 7.2.) значајно је промењена примењеним протоколима ( $F=12.157$ ). У поређењу са вредностима из контролне групе, сва три индивидуално примењена третмана наночестица СаPs-а утицала су на смањење вредности SOD активности ( $p<0.01$  за HA и ACP групу, док код TCP групе није уочена статистичка значајност иако је дошло до смањења вредности SOD). Највећи пад активности уочен је у ACP групи и био је значајан чак и у поређењу са TCP групом ( $p<0.01$ ). Примена антиоксидантне суплементације утицала је на повећање активности ензима (значајно за SOD у ACP+FU групи,  $p<0.05$ ), међутим, вредности у комбинованим групама нису успеле да достигну контролне.

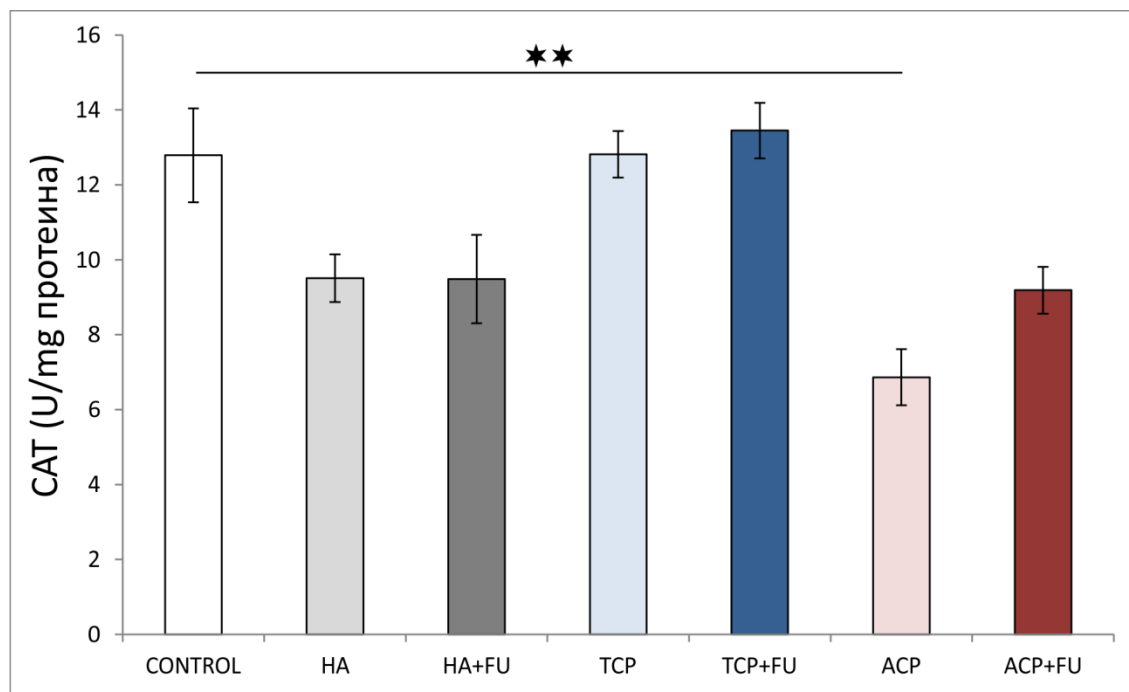


**Слика 7.2. Вредности супероксид дисмутазе (SOD) у ткиву тестиса након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, ACP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, ACP+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као \*\* $p<0.01$ .**

#### 4.6.3. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на промене нивоа каталазе у ткиву тестиса

Слика 7.3. приказује да је активност САТ антиоксидативног ензима након примењених протокола у овој студији значајно промењена ( $F= 8.045$ )

Наночестице СаPs-а индивидуално примењене редуковале су активност САТ-а у поређењу са контролним вредностима, али је статистичка значајност уочена једино у АСР групи ( $p<0.01$ ). Антиоксидантна суплементација није показала значајан пораст вредности САТ ензима.

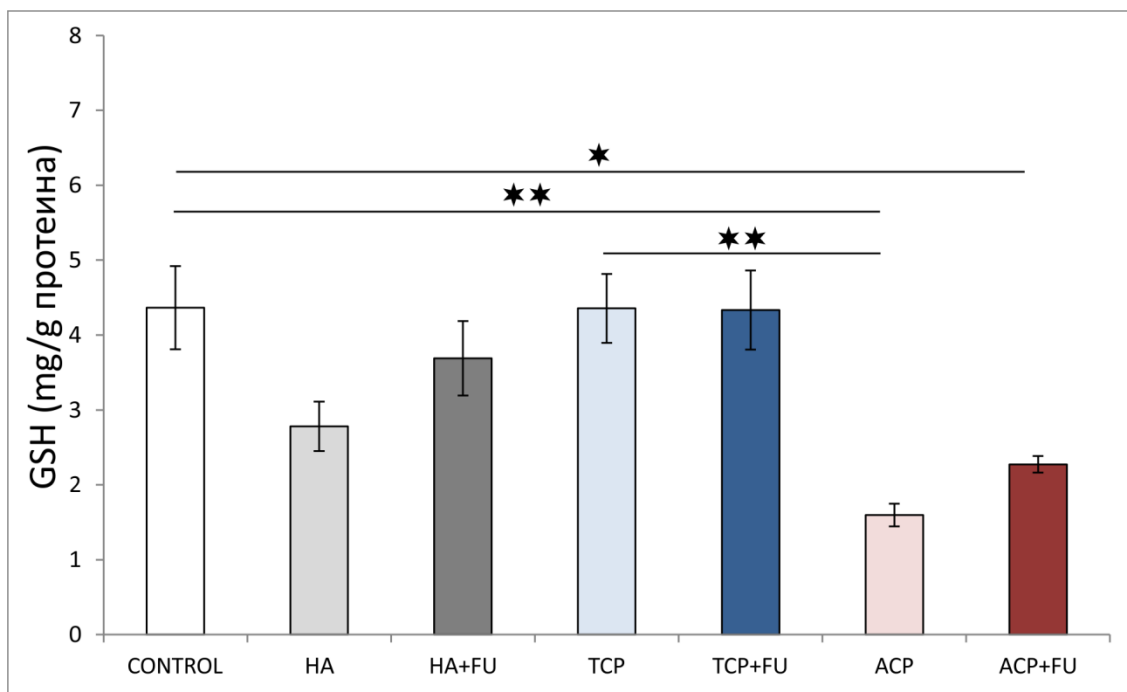


**Слика 7.3. Вредности каталазе (САТ) у ткиву тестиса након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, АСР – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, АСР+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као  $**p<0.01$ .**

#### 4.6.4. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на нивое глутатиона у ткиву тестиса

Неензимски антиоксидативни капацитет у тестису изражен као GSH (Слика 7.4.), био је мање значајно измењен ( $F=7.512$ ).

Про-оксидантно деловање АСР-а такође је примећено помоћу концентрације GSH-а у ткиву тестиса. Продужени унос АСР-а резултирао је значајним падом GSH-а у поређењу са контролном и TCP групом ( $p<0.01$ ). Када је екстракт FU примењиван заједно са АСР-ом, нивои GSH-а остали су испод контролних вредности ( $p<0.05$ ).

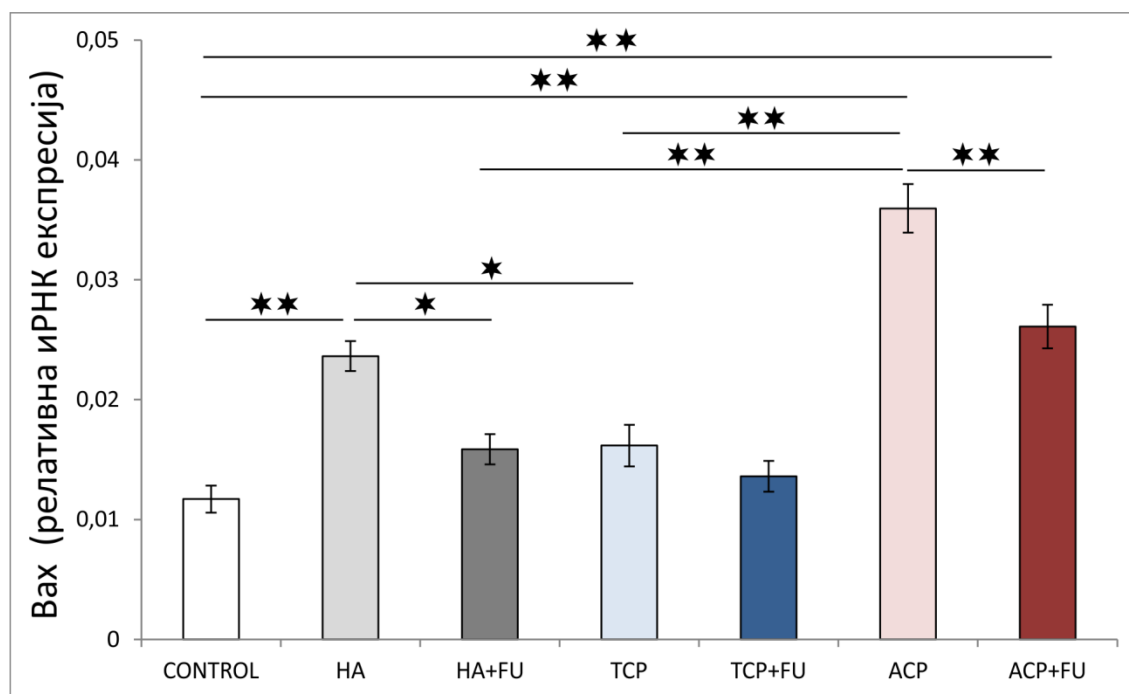


**Слика 7.4.** Вредности укупног глутатиона (GSH) у ткиву тестиса након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, АСР – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, АСР+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као \* $p<0.05$  и \*\* $p<0.01$ .

#### 4.6.5. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на релативну генску експресију проапоптотског гена – Вах у ткиву тестиса

Равнотежа између релативне експресије гена про- и анти- апоптотских фактора такође је значајно померена према апоптози помоћу релативне експресије Вах-а (Слика 7.5.,  $F=31.611$ ).

Релативна експресија гена Вах-а у ткиву тестиса значајно је повећана применом НА и АСП у поређењу са контролом ( $p<0.01$ ), као и са ТСП групом ( $p<0.05$  за НА и  $p<0.01$  за АСП). Такође, тестикуларна експресија Вах-а примећена у АСП групи била је значајно изнад вредности у НА групи ( $p<0.05$ ). Иако је антиоксидантна суплементација значајно смањила релативну експресију Вах гена у поређењу са групом у којој су се примењивале само наночестице СаPs-а ( $p<0.05$  за НА и  $p<0.01$  за АСП), експресија Вах-а била је значајно изнад контролних вредности у комбинованој групи АСП+FU ( $p<0.01$ ).

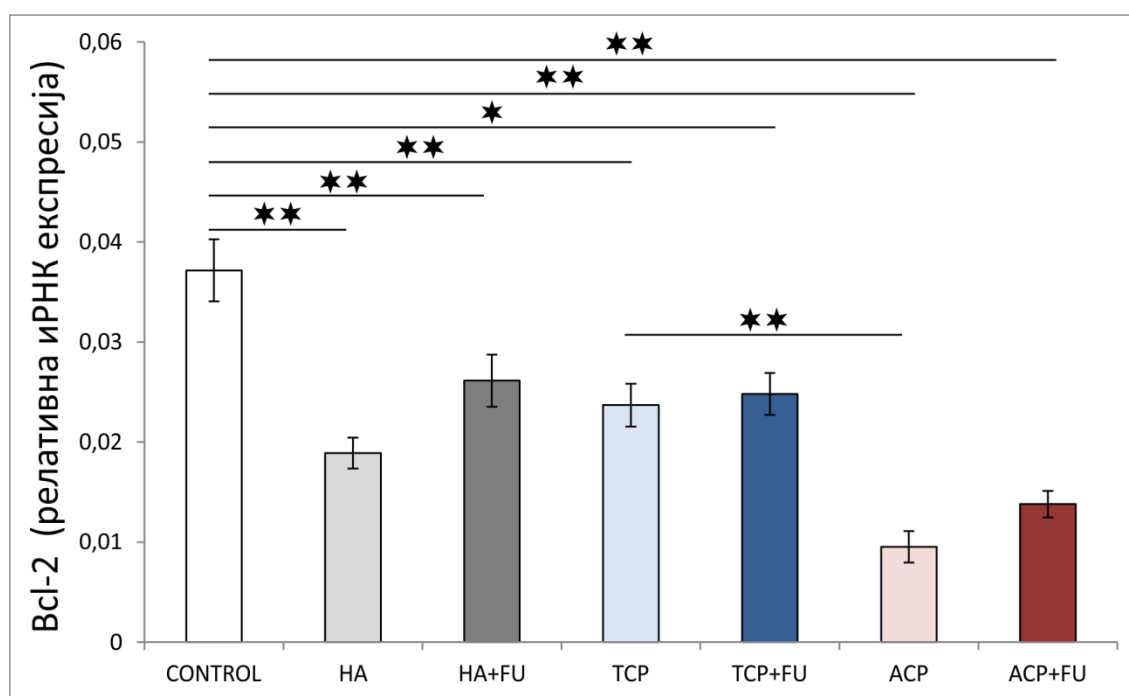


**Слика 7.5.** Промене релативне генске експресије mRNA за Вах у ткиву тестиса након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, НА – животиње третиране хидроксиапатитом, ТСП – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, АСП – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, НА+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, ТСП+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, АСП+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као

\* $p < 0.05$  и \*\* $p < 0.01$ .

4.6.6. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на релативну генску експресију антиапоптотског гена – Bcl-2 у ткиву тестиса

Наночестице CaPs-а су веома снажно утицале на анти-апоптотске – Bcl-2 (Слика 7.6.,  $F= 17.877$ ) гене. Експресија Bcl-2 гена у ткиву тестиса је значајно смањена код све три форме примењених наночестица CaPs-а у поређењу са контролом ( $p<0.01$ ), са најистакнутијим одговором на ACP ( $p<0.01$  у поређењу са TCP). Антиоксидативна суплементација FU екстрактом није значајно побољшала анти-апоптотски капацитет, изражен кроз Bcl-2, будући да су вредности стално биле испод контролних вредности ( $p<0.05$  за HA и  $p<0.01$  за TCP и ACP).

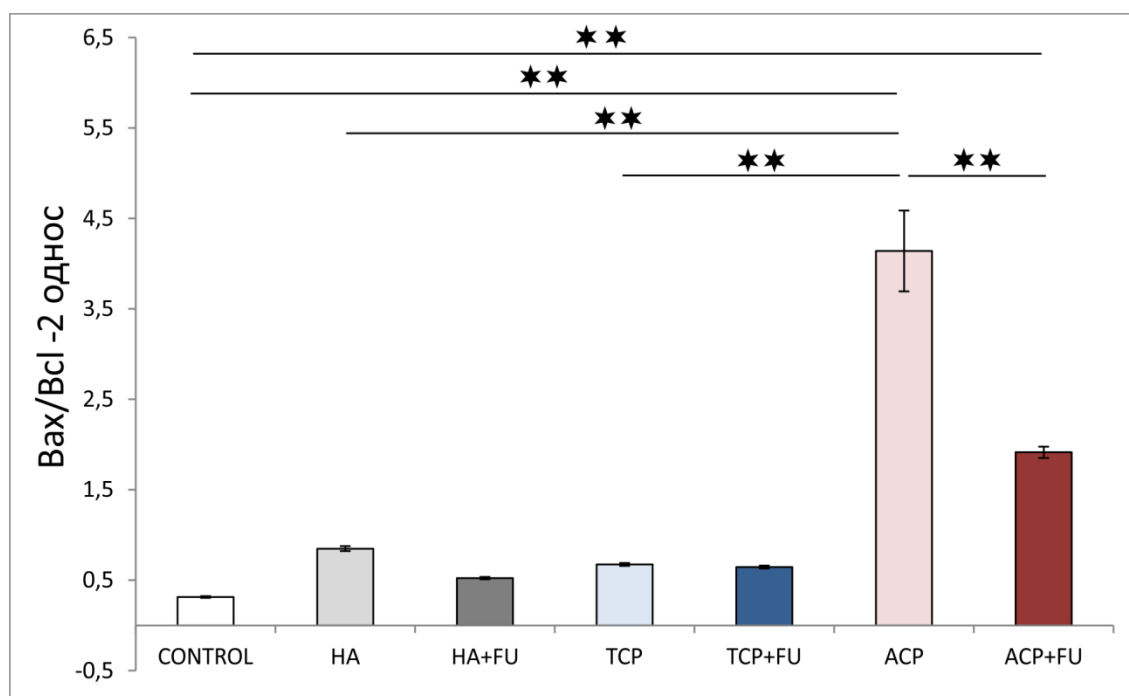


**Слика 7.6. Промене релативне генске експресије mRNA за Bcl-2 у ткиву тестиса након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, HA – животиње третиране хидроксиапатитом, TCP – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, ACP – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, HA+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, TCP+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, ACP+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као \* $p<0.05$  и \*\* $p<0.01$ .**



#### 4.6.7. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на однос релативне генске експресије проапоптотских и антиапоптотских гена (однос Вах/Всl-2) у ткиву тестиса

Про-апоптотско деловање наночестица СаPs-а у тестисима мужјака пацова потврђено је значајним променама у односу Вах/Всl-2 (Слика 7.7.,  $F=62.745$ ). Међутим, најзначајније промене примећене су у АСР групи где је однос Вах/Всl-2 био значајно изнад контроле као и у НА и ТСР групама ( $p<0.01$ ). Иако је екстракт FU, када се примењује са АСР-ом, изазвао значајан пад у односу Вах/Всl-2 ( $p<0.01$ ), вредности су остале изнад контроле ( $p<0.01$ ).

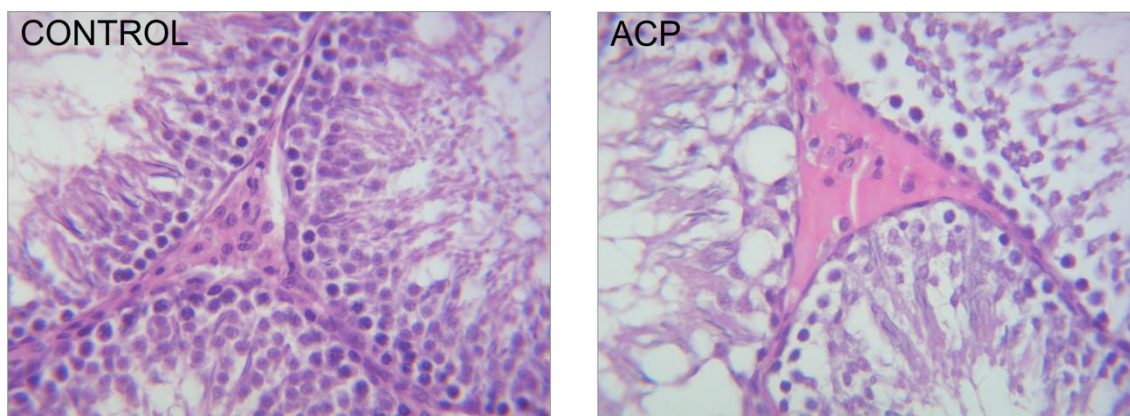


**Слика 7.7.** Промене релативне генске експресије mRNA (однос Вах/Всl-2) у ткиву тестиса након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (6 животиња по групи). CONTROL – животиње из контролне групе, НА – животиње третиране хидроксиапатитом, ТСР – животиње третиране трикалцијум фосфат хидратом, АСР – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом, НА+FU – животиње симултано третиране хидроксиапатитом и FU екстрактом, ТСР+FU – животиње симултано третиране трикалцијум фосфат хидратом и FU екстрактом, АСР+FU – животиње симултано третиране аморфним калцијумфосфатом и FU екстрактом. На стубичастом дијаграму су представљене средње вредности параметра  $\pm$  SEM, значајности су представљене као  $***p<0.01$ .

#### 4.6.8. Утицај администрације наночестица калцијумфосфата са или без симултане антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на патохистолошке промене у ткиву тестиса

Једномесечна администрација наночестица калцијумфосфата је за последицу имала манифестне хистолошке промена у ткиву јетре, при чему је симултана примена антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* ублажавала уочене промене. Патохистолошка анализа акумулације липида у ткиву јетре, обојеним Oil-Red-O техником, показала је интрацелуларну микровезикуларну стеатозу која је била најистакнутија у АСР групи (Слика 6.8.).

Хронична перорална апликација наночестица калцијумфосфата је за резултат показала уочљиве промене архитектуре ткива тестиса, уз значајну напомену да је интензитет промена био значајно умањен симултаном применом антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria*. Патохистолошка анализа ткива тестиса показала је значајне промене у структури ткива код пацова третираних АСР-ом. Уочен је значајно мањи број Лејдигових ћелија у интерстицијуму тестиса. Такође, у интерстицијумским просторима пацова третираних АСР-ом биле су присутне ћелије са кондензованим хроматином са пикнотичним једрима. У овој експерименталној групи, структура епитела изувијаних семених каналића је, такође, значајно промењена у смислу смањења броја ћелија герминативног епитела (Слика 7.8.).



**Слика 7.8. Патохистолошке промене у ткиву тестиса (репрезентативне фотомикрографије) након спроведених третмана различитим врстама нано-калцијумфосфата са или без истовремене примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria*. CONTROL – животиње из контролне групе, АСР – животиње третиране аморфним калцијумфосфатом.**

## **5. ДИСКУСИЈА**

## 5.1. Нежељени ефекти хроничне примене калцијумфосфата

Иако се CaPs могу сматрати материјалима будућности у различитим биомедицинским применама, потенцијални здравствени ризици повезани са њиховом употребом су често потцењени, посебно када је изложеност наночестицама континуирана и обично се дешава без видљиве манифестације. Штавише, постоји евидентна неравнотежа у ставовима јавности између промовисања свих бенефита које нови наноматеријали повлаче за собом, укључујући наночестице CaPs-а, као и опреза с обзиром на њихове потенцијалне нежељене ефекте које су показали (Табела 3). Стога, чини се неопходним упозоравати јавност о потенцијалним факторима ризика повезаних са њиховом медицинском применом. У циљу омогућавања систематичнијег увида у нежељене ефекте наночестица, знање из ове области треба концизније презентовати. Пре свега, истраживања овог медицинског проблема морају се стандардизовати помоћу величине и облика честица, затим површинског састава и ослобађања биолошки активних врста (103). Коначно, начин примене наночестица CaPs-а треба сматрати једним од најважнијих аспеката у дизајну експеримента.

Табела 3. Резиме резултата за орган-специфичне органе.

Третман		Оксидативно оштећење		Ефекат (орган) Апоптоза		Структурне промене	
бубрег							
НА	НА+FU	↑↑↑	↓↓	б.п.	б.п.	б.п.	б.п.
ТСР	ТСР+FU	↑↑↑	↓↓	б.п.	б.п.	б.п.	б.п.
АСР	АСР+FU	↑↑↑	↓↓	↑↑	↓↓	↑	↓
Јетра							
НА	НА+FU	↑↑	↓↓	↑↑	↓	б.п.	б.п.
ТСР	ТСР+FU	↑	↓	↑	↓	б.п.	б.п.
АСР	АСР+FU	↑↑↑	↓	↑↑↑	↓↓	↑	↓
Тестис							
НА	НА+FU	↑↑	↓↓↓	↑↑	б.п.	б.п.	б.п.
ТСР	ТСР+FU	б.п.	б.п.	↑	б.п.	б.п.	б.п.
АСР	АСР+FU	↑↑↑	↓	↑↑↑	↓↓	↑↑	↓

\*Стрелице представљају квалитативни опис промена у процењеним параметрима. (б.п. = без промена)

## 5.2. Утицај хроничне примене наночестица калцијумфосфата на бубрежно ткиво

### 5.2.1. Про-оксидативно деловање наночестица калцијумфосфата и протективно деловање екстракта биљке *Filipendula ulmaria* на оксидативни еквилибријум у бубрежном ткиву

Како бисмо имитирали аутентичан начин преношења наночестица у људској популацији, спровели смо орални унос испитиваних наночестица CaPs-а (растворених у води са чесме), са сталним приступом води током 24 сата. Као што је раније напоменуто, укупна дневна доза израчуната је на основу пријављеног ослобађања наночестица из зубних композита добијених *in vitro* (82), разблажена у запремини воде која је унета у претходна 24 сата да би се постигао континуирани унос одговарајуће концентрације. Такође, примећено је да је екстракт FU у дози од 100 mg/kg показао најзначајније корисне системске ефекте када се примењује заједно са супстанцом која доводи до оксидативног оштећења. Примена ниже дозе не пружа адекватну заштиту, док већа доза обезбеђује прооксидативно деловање чак и када се примењује самостално, стога, доза од 100 mg/kg произвела је користан ефекат умањењем оксидативне неравнотеже (96).

Протоколи примењени у овом истраживању нису значано утицали на серумске нивое креатинина или уреје (Слика 2.2. и 2.3., редом). Иако је хронична примена наночестица CaPs-а резултирала занемарљивим променама индикатора бубрежне функције у периферној крви, анализом индикатора оксидативног стреса у бубрежном ткиву показано је да су протоколи примењених наночестица CaPs-а утицали на значајно погоршање маркера оксидативног стреса. Про-оксидантно дејство све три примењене форме наночестица CaPs-а манифестовано је повећаном производњом реактивних кисеоничних врста – ROS (повећање индекса липидне пероксидације, (Слика 5.1.) и смањеним антиоксидативним капацитетом. Занимљиво је да су ензимски (активност SOD и CAT, Слика 5.2. и 5.3., редом) и неензимски (GSH, Слика 5.4.) антиоксидативни механизми били нарушени, али треба приметити да су нивои GSH-а минимизирани тек након продужене примене НА. Штавише, чини се очигледним да је истовремена, комбинована примена антиоксидантне суплементације екстрактом FU спречила про-оксидативно дејство примењених наночестица CaPs-а у оквиру свих процењених показатеља оксидативног стреса у бубрежном ткиву. Тако је екстракт FU умањео хиперпродукцију ROS-а изазвану наночестицама CaPs-а (изузев у АСР групи), али је и обновио антиоксидативни капацитет повећањем активности антиоксидативних ензима као и враћањем нивоа GSH-а на контролне вредности. Због недостатка података о деловању других наночестица CaPs-а на бубрежну функцију *in vivo*, наше резултате можемо упоредити једино са најсвеобухватније процењеним нефротоксичним ефектима НА. Заиста, наши резултати су у сагласности са резултатима везаним за нефротоксичност изазвану НА, добијену под различитим експерименталним условима. Mosa и сарадници такође су пријавили про-оксидативно деловање НА у бубрежном ткиву након хроничне примене код мужјака пацова (85), што се манифестовало повећаном производњом ROS-а и изразитим падом свих антиоксидативних одбрамбених механизма, укључујући и укупни антиоксидативни капацитет. Предложени механизам про-оксидативног деловања НА заснован је на претходним налазима да

наночестице унутар ћелије промовишу неравнотежу између оксиданата и антиоксиданата са последичним интрацелуларним оксидативним стресом (104). Интрацелуларно про-оксидативно деловање наночестица може се манифестовати утицајем у различитим интрацелуларним структурама на основу модификације липида, протеина и нуклеинских киселина (104). Иако нема специфичних података за бубрежно ткиво, уочено про-апоптотско деловање наночестица CaPs-а по протоколима примењеним у овом експерименту може се упоредити само са претходно пријављеним општим про-оксидантним путевима описаним за наночестице HA *in vitro*. Xu и сарадници су пратили дозно зависно про-оксидантно дејство у C6 ћелијама као акутни одговор на наночестице HA (105). Сличан про-оксидативни ефекат наночестица HA потврђен је на остеобластним ћелијама MC3T3-E1, са посебним утицајем на митохондријске путеве (82). Ови истраживачи, иако са различитим дозама и временском изложеношћу, пријавили су и повећану производњу ROS-а и смањени антиоксидативни капацитет након примене наночестица HA.

## 5.2.2. Про-оксидативно деловање наночестица калцијумфосфата и протективно деловање екстракта биљке *Filipendula ulmaria* на апоптотске механизме у бубрежном ткиву

Утицај примењених наночестица CaPs-а на апоптотске маркере био је значајан једино у АСР групи (Слика 5.5., 5.6. и 5.7.). Занимљиво је да је про-апоптотско деловање АСР-а потврђено не само у поређењу са контролном групом, већ и у поређењу са друге две примењене форме наночестица CaPs-а и задржало се чак и након антиоксидативне суплементације екстрактом FU. Поново, без специфичних података о утицају наночестица CaPs-а на показатеље апоптозе у ткиву бубрега, можемо само констатовати да су наши резултати у складу са претходним извештајима о про-апоптотском деловању наночестица CaPs-а добијених у *in vitro* студијама. Примена наночестица НА резултирала је потенцирањем апоптозе у остеобластима и макрофагима повећањем експресије p53 гена и активности породице каспазе и истовременим снижавањем Bcl-2 (106, 107). Истовремено, објављено је да су АСР наночестице индуковале апоптозу ћелија леукемије селективним ефектом у G1 фази (108).

Најистакнутија про-оксидативна и апоптотска дејства, примењена у АСР групи, праћена су морфолошким променама у бубрежном ткиву, које су се превасходно манифестовале вакуолизацијом проксималног завијеног епитела тубула и ћелија гломерула (Слика 5.8.). Није изненађујуће да бубрежно ткиво пролази кроз значајне промене услед потенцијално токсичних супстанци због велике брзине протока крви, која заузврат испоручује повишене концентрације наночестица CaPs-а у бубрег. Штавише, епител проксималних тубула подложнији је нефротоксичности, што је потврђено у овој студији. Ова специфична локална афекција може се приписати чињеници да ове ћелије експирмирају различите транспортере, који омогућавају активан унос и интрацелуларну акумулацију токсичних једињења (109).

Под стандардизованим условима који омогућавају поређење појединачних ефеката наночестица CaPs-а на бубрежну функцију, а како је изведено у овој студији, чини се да је нефротоксичност помоћу свих процењених нивоа била најистакнутија у групи третираној АСР-ом, са мање штетних ефеката примењених у НА групи а посебно код пацова третираних ТСР-ом. Међутим, у обзир треба узети и да само повећање фосфатног оптерећења може значајно утицати на морфологију и функцију бубрега (110). Стога, није изненађујуће што је хиперкалцемија потврђена тек након третмана АСР-ом. Уочено повећање нивоа калцијума у серуму постигнуто пролонгираним оралним уносом АСР-а није било значајно само у поређењу са контролом већ и у поређењу са ТСР групом. Међутим, истовремена примена екстракта FU била је довољна да ублажи настали пораст калцемије изазване АСР-ом.

Као што се очекивало, нисмо у могућности да упоредимо наше резултате везане за утицај антиоксидантне суплементације екстрактом биљке са другим извештајима који су користили исто природно једињење богато антиоксидантима. Стога, можемо потврдити да је заштитна улога антиоксиданата, како је уочено у овој студији, у складу са претходно пријављеним благотворним дејством куркумина и хитосана на механизме нефротоксичности изазване НА, помоћу њихових антиоксидативних и анти-апоптотских дејстава, заједно са обновом ткивне архитектуре (85).

## 5.3. Утицај хроничне примене наночестица калцијумфосфата на ткиво јетре

### 5.3.1. Утицај наночестица калцијумфосфата на метаболичке функције јетре

Пролонгирани орални унос наночестица CaPs-а у дозама примењеним у овој студији није утицао ни на један ензим јетре (ALP, ALT и AST) (Слика 4.2., 4.3. и 4.4. редом), али су нивои LDH били знатно изнад контролних вредности након продужене примене АСП-а. Серумски LDH забележен у АСП групи био је значајно већи у поређењу са животињама тренираним ТСП-ом. Међутим, овај ефекат АСП-а је спречен истовременом применом екстракта FU (Слика 4.1.). Са друге стране, примењени протоколи су значајно утицали на показатеље метаболичких функција јетре. Занимљиво је да, иако ни HA ни ТСП нису променили ниво серума, примена АСП-а довела је до повећања нивоа триглицерида, LDL, и укупног холестерола, као и cholesterol ratio (Слика 3.1., 3.2., 3.4. и 3.5.). Те манифестације дислипидемије су укинута додавањем антиоксидантне суплементације екстрактом FU. Резултати добијени у овој студији се подударују са претходним налазима Chen-а и сарадника (111), у смислу повећаног LDH и непромењеног нивоа ALP-а у серуму након примене наночестица HA. Слично повећање нивоа LDH у серуму након примене HA наночестица је постигнуто преко дозне зависности у *in vitro* експерименталном моделу (86). За разлику од претходно поменутог истраживања, третмани наночестицама CaPs-а примењених у овој студији нису повећали нивое ALT и AST у серуму. Та одступања могу се приписати разликама у експерименталном дизајну, укључујући примењену дозу (три пута већу од наше), дужини изложености и начину примене. Ово се такође може сматрати индиректном потврдом да повреда јетре након примене наночестица CaPs-а у овој студији није била тако озбиљна као у студији коју су спровели Chen и сарадници. Недавна студија Parasa и истраживача (112) такође није показала значајне промене у AST и ALT нивоима након хроничне примене наночестица HA (120 дана). Промене у профилу липида уочене у нашој студији такође су у складу са пријављеним повећањем укупног холестерола и LDL нивоа у серуму након примене наночестица HA (111).



### 5.3.2. Про-оксидативно деловање наночестица калцијумфосфата и протективно деловање екстракта биљке *Filipendula ulmaria* на оксидативни еквилибријум у ткиву јетре

Процена маркера оксидативног стреса у ткиву јетре открила је значајан утицај примењених протокола. Продукцију ROS-а (изражену кроз индекс липидне пероксидације) значајно су појачали НА и АСР, при чему ТСП није показао значајан ефекат (Слика 6.1.). Ова манифестација про-оксидативног деловања успешно је решена увођењем екстракта FU у НА групи, али је остала изнад контролних вредности код животиња третираних АСР-ом. У исто време, ензимска антиоксидативна одбрана процењена кроз активност SOD и CAT је значајно смањена код животиња третираних НА и АСР-ом и опет без значајног утицаја ТСП-а (Слика. 6.2. и 6.3., редом). Занимљиво је да је пад активности антиоксидативних ензима у НА и АСР групи значајно повећан чак и у поређењу са ТСП групом, а остао је нижи чак и након истовремене суплементације антиоксидантима. Ниво GSH-а у узорку ткива јетре смањени су само код пацова третираних АСР-ом, али је то спречено применом екстракта FU (Слика 6.4.). Наши резултати одговарају подацима добијеним у моделу ћелија јетре пацова (86), где су наночестице НА утицале на дозно зависно повећање укупног оксидативног стреса и истовремени пад укупног антиоксидативног капацитета. Такође, појединачна доза од 50 mg/kg наночестица НА резултирала је про-оксидативним деловањем у узорцима јетре пацова (111). Као и у нашој студији, чак је и акутни одговор на наночестице НА резултовао порастом липидне пероксидације, смањеном активношћу SOD-а и смањеним садржајем GSH-а. Због недостатка литературних података за друге наночестице CaPs-а, наше резултате можемо упоредити једино са другим нано металним једињењима, и претпоставити да би про-оксидативно деловање, како је и примењено у овој студији, могло бити посредовано JNK/P53 и NF-κB путевима (113).

### 5.3.3. Про-оксидативно деловање наночестица калцијумфосфата и протективно деловање екстракта биљке *Filipendula ulmaria* на апоптотске механизме у ткиву јетре

Про-апоптотски ефекат примењених наночестица CaPs-a изражен је и повећањем релативне експресије про-апоптотског гена (Слика 6.5.) и смањењем релативне експресије анти-апоптотског гена (Слика 6.6.), а потврђен је и њиховим односом (Слика 6.7.). За разлику од оксидативног стреса, апоптотски маркери су били значајно погођени са све три примењене форме наночестица CaPs-a, али је овај ефекат спречен истовременом применом екстракта FU, изузев код животиња третираних АСР-ом. Структурне промене праћене про-оксидативним и апоптотским деловањем наночестица CaPs-a у узорцима ткива јетре манифестовале су се претежно акумулацијом липида у форми интралобуларне микровезикуларне стеатозе. Није изненађујуће да су морфолошке промене биле најистакнутије у АСР групи (Слика 6.8.). Опет, иако са другачијим експерименталним дизајном, очигледно је да су наши резултати у складу са претходно пријављеним про-апоптотским деловањем наночестица НА (111). Међутим, структурне промене описане у том истраживању се не подударају са резултатима добијеним у нашем истраживању. Наиме, за разлику од Chen-овог извештаја који потенцира упални одговор у јетри након примене НА, наши експериментални протоколи резултирали су микровезикуларном стеатозом. Уочене разлике могу бити објашњене чињеницом да би акутни одговор на високе дозе наночестица НА могао изазвати тренутни хепатотоксични ефекат који се манифестује инфилтрацијом инфламаторних ћелија, док би хронични третман са нижом дозом наночестица НА претежно изазвао стеатотички ефекат.

Очигледна корисна улога антиоксидативне суплементације екстрактом биљке FU на хепатотоксичност изазвану наночестицама CaPs-a, не може се упоредити са сличним извештајима. Међутим, иако је већ познато да суплементација екстрактом FU има заштитну улогу преко антиоксидативних и антиинфламаторних ефеката (96), потврда предности коришћења овог екстракта након примене наночестица CaPs-a могла би се наћи једино у одређеним регијама мозга (81).

## 5.4. Утицај хроничне примене наночестица калцијумфосфата на ткиво тестиса

### 5.4.1. Про-оксидативно деловање наночестица калцијумфосфата и протективно деловање екстракта биљке *Filipendula ulmaria* на оксидативни еквилибријум у ткиву тестиса

Хронична примена наночестица CaPs-а у овој студији значајно је променила ниво тестостерона у серуму. Међутим, значајно смањење нивоа тестостерона у серуму (за приближно 50%) примећено је у HA и ACP групи, без значајног утицаја у TCP групи (Слика 4.5.). Пад нивоа тестостерона у серуму изазван наночестицама HA и ACP, успешно је ослабљен применом екстракта FU. Примећени протоколи су још више утицали на ниво LH у серуму. Наиме, све примећене форме наночестица CaPs-а су смањиле ниво LH у серуму али за разлику од тестостерона, пад LH у серуму је трајао у свим експерименталним групама чак и уз истовремену суплементацију антиоксидансима (Слика 4.6.). Пад тестостерона примећен у овој студији након примене наночестица CaPs-а је у сагласности са недавно пријављеним ефектом хроничне примене наночестица HA на серумске нивое тестостерона, док снижавање LH није у складу са резултатима сличних истраживања (87). Стога, морамо приметити да је постојала значајна разлика у дизајну експеримента у поменутој студији у којој је предтретман био 50% дужи, а дневна доза 15 пута већа. Међутим, основни механизам промене полних хормона може се наћи у значајном смањењу интерстицијских ћелија у тестисима које су главни извор тестостерона. Штавише, овај механизам је вероватно одговоран за уочене промене у герминативном епителу.

Прооксидативно деловање наночестица CaPs-а у ткиву тестиса потврђено је са различитих аспеката. Повећана производња ROS-а и пад SOD активности примећени су код животиња третираних са HA и ACP-ом (Слика 7.1. и 7.2.), док је индивидуална примена наночестица ACP смањила активност CAT-а и ниво GSH (Слика 7.3. и 7.4.). Најизраженије про-оксидативно деловање ACP-а остало је чак и након истовремене примене екстракта FU. Вреди напоменути да примена TCP-а није изазвала значајан про-оксидативни одговор. Исти одговор на наночестице HA примећен је у студији која је процењивала репродуктивну токсичност (87). Због недостатка других литературних извора за наночестице CaPs-а, можемо само упоредити наше резултате са претходно пријављеним оксидативним оштећењима код других врста изазваних металним наночестицама (114).

#### 5.4.2. Про-оксидативно деловање наночестица калцијумфосфата и протективно деловање екстракта биљке *Filipendula ulmaria* на апоптотске механизме у ткиву тестиса

Док су све три примењене форме наночестица CaPs-а изазвале смањење релативне експресије гена Bcl-2 (Слика 7.6.), само су наночестице HA и ACP повећавале релативну експресију гена Вах-а у ткиву тестиса. Са друге стране, примена екстракта FU значајно је смањила Вах, али није имала утицај на промене Bcl-2 изазване наночестицама CaPs-а. Про-апоптотски потенцијал, изражен као однос Вах/Bcl-2, достигао је највише нивое код животиња третираних ACP-ом. Резултати који се односе на про-апоптотско деловање добијени у овој студији могу бити поткрепљени претходно пријављеним ефектом наночестица HA који укључује повећање p53 and TNF- $\alpha$  (87).

У ткиву тестиса, примењене су значајне промене у архитектури ткива након третмана ACP-ом. Најважнија разлика у односу на контролну групу била је смањење броја интерстицијских ћелија тестиса што је било праћено смањеним бројем и промењеном структуром приметних епителних ћелија (Слика 7.8.). Наши резултати су у складу са смањењем Лејдигових ћелија као последица третмана наночестица HA (87), као и са резултатима да наночестице сребра смањују број матичних ћелија приметне линије у тестисима (114).

Користан одговор на истовремену примену екстракта FU манифестован сузбијањем дисфункције гонада изазване наночестицама CaPs-а, потврђено је на различито процењеним нивоима: серумски нивои полних хормона, оксидативни и про-апоптотски индикатори, као и структурне промене у тестисима. Међутим, не постоје литературни подаци за специфично деловање FU, па можемо само коментарисати да су наши резултати у складу са претходно пријављеном заштитном улогом других антиоксиданата (попут куркумина и хитосана) на гонадотоксичност изазвану наночестицама (87).

## **6. ЗАКЉУЧЦИ**

Анализом добијених резултата, из наше студије могу произаћи следећи закључци:

1. Хронично, системско деловање наночестица калцијум-фосфата може бити праћено озбиљним системским и орган-специфичним ефектима.
2. Примена наночестица калцијум-фосфата након дуге примене доводи до морфо-функционалних промена јетре, бубрега и тестиса.
3. Промењене вредности биохемијских параметара и концентрације полних хормона пацова настале третманом наночестица калцијум-фосфата, самостално или заједно са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* могу бити удружене са променама оксидативног стреса и апоптозе у ткивима јетре, бубрега и тестиса.
4. Резултати ове студије могу дати смернице за даља истраживања потенцијалне медицинске примене материјала за надокнаду ткива која треба да укључе и систематску процену нуспојава.
5. Такође, очекује се да би антиоксидативна суплементација природним антиоксидантима могла бити начин за превенирање системске токсичности у широкој и све чешћој примени наночестица калцијум-фосфата у свим гранама стоматологије.

## **7. ЛИТЕРАТУРА**

1. Lewandrowski K, Gresser JD, Wise DL, Trantolo DJ. Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: an histologic evaluation of osteointegration of poly (propylene glycol-co-fumaric acid) based cement implants in rats. *Biomaterials* 2000; 21(8): 757-764.
2. Poirier, J., Ribadeau Dumas, J.L., Catala, M., et al. *Histologie: les tissus.* (2002). Médecine 1ere année. 2eme éd. Paris: Masson, 2002.
3. Donati D, Zolezzi C, Tomba P, Viganò A. Bone grafting: historical and conceptual review, starting with an old manuscript by Vittorio Putti. *Acta Orthop.* 2007; 78(1): 19-25.
4. Fernandez de Grado G, Keller L, Idoux-Gillet Y, Wagner Q, Musset AM, Benkirane-Jessel N, Bornert F, Offner D. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *J Tissue Eng.* 2018; 9: 2041731418776819.
5. Dressman H. Ueber Knochenplombierung bei Hohlenformigen Defekten des Knochens. *Beitr Klin Chir* 1892; 9: 804-810.
6. Martin E. Zur AisfuIIune von Knochenhohlen mit todttem Material. *Zentralbl Cbir.* 1894; 2I: I 93 200.
7. McGovern JA, Griffin M, Hutmacher DW. Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. *Dis Model Mech.* 2018; 11(4): dmm033084.
8. Gabriele Sommer, N., Hahn, D., Okutan, B., Marek, R., & Weinberg, A.-M. (2020). *Animal Models in Orthopedic Research: The Proper Animal Model to Answer Fundamental Questions on Bone Healing Depending on Pathology and Implant Material (1st. ed.).* *Animal Models in Medicine and Biology.* Eva Tvrdá and Sarat Chandra Yeniseti, IntechOpen.
9. Li Y, Chen SK, Li L, Qin L, Wang XL, Lai YX. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *J Orthop Translat.* 2015; 3(3): 95-104.
10. Clements JR, Carpenter BB, Pourciau JK. Treating segmental bone defects: a new technique. *J Foot Ankle Surg.* 2008; 47(4): 350-356.
11. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3(3): 131–139.
12. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005; 36(3): S20-7.
13. Gilbert, S.F. (2000). *Developmental Biology.* 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9983/>.
14. Saima S, Jan SM, Shah AF, Yousuf A, Batra M. Bone grafts and bone substitutes in dentistry. *J Oral Res Rev.* 2016; 8(1): 36-38.
15. Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg.*



1996; 35(5): 413-417.

16. Wypych, G. (2018) Functional fillers – Chemical Composition, Morphology, Performance, Applications (1st. ed.). Functional Fillers. ChemTec Publishing, 153-179.

17. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001; 10(2): S96-101.

18. Parithimarkalaigan S, Padmanabhan TV. Osseointegration: An Update. *The Journal of Indian Prosthodontic Society* 2013; 13(1): 2–6.

19. Hudecki, A, Kiryczyński G, Łos MJ. Biomaterials, Definition, Overview. *Stem Cells and Biomaterial for Regenerative Medicine* 2019; 85–98.

20. Albrektsson T, Branemark P-I, Hansson H-A, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand.* 1981; 52: 155–170.

21. Eriksson RA, Albrektsson T. The effect of heat on bone regeneration. *J Oral Maxillofacial Surg.* 1984; 42: 701–711.

22. Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng* 2004; 32(3): 477-86.

23. Schallhorn RG. Present status of osseous grafting procedures. *J Periodontol.* 1977; 48(9): 570-576.

24. Kumar P, Vinitha B, Fathima G. Bone grafts in dentistry. *J Pharm Bioallied Sci.* 2013; 5(1): S125-127.

25. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res.* 2000; 371: 10-27.

26. Dodd CA, Fergusson CM, Freedman L, Houghton GR, Thomas D. Allograft versus autograft bone in scoliosis surgery. *J Bone Joint Surg Br.* 1988; 70(3): 431-434.

27. Summers BN, Eisenstein SM. Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion. *J Bone Joint Surg Br.* 1989; 71(4): 677-680.

28. Friedlaender GE, Strong DM, Tomford WW, Mankin HJ. Long-term follow-up of patients with osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome. *Orthop Clin North Am.* 1999; 30(4): 583-538.

29. Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater.* 1991; 2(3): 187-208.

30. Goldberg VM, Stevenson, S, Shaffer JW. Biology of autografts and allografts. In: Friedlander

GE, Goldberg VM, editors. Bone and cartilage allografts: biology and clinical applications. Park Ridge, Illinois: The American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1991: 3—11.

31. Hubbell JA. Biomaterials in tissue engineering. *Biotechnology (N Y)*. 1995; 13(6): 565-576.
32. Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, Lattanzi W, Logroscino G. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci Mater Med*. 2014; 25(10): 2445-2461.
33. Albanese A, Licata ME, Polizzi B, Campisi G. Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration. *Immun Ageing* 2013; 10(1): 23.
34. Chai F, Raoul G, Wiss A, Ferri J, Hildebrand HF. Bone substitutes: Classification and concerns. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*. 2011; 112(4): 212-221.
35. Liodaki E, Kraemer R, Mailaender P, Stang F. The Use of Bone Graft Substitute in Hand Surgery: A Prospective Observational Study. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95(24): e3631.
36. Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 2000; 31(4): 37-47.
37. Habraken W., Habibovic P., Epple M., Bohner M. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? *Mater Today* 2016; 19: 69–87.
38. Dorozhkin S.V., Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew. Chem Int Ed Engl*. 2002; 41(17): 3130–3146.
39. Epple M, Kovtun A. Functionalized Calcium Phosphate Nanoparticles for Biomedical Application. *Key Eng Mater*. 2010; 441: 299–305.
40. LeGeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr. Oral Sci*. 1991; 15: 1-201.
41. Brown P.W., Constantz B. *Hydroxyapatite and Related Materials*, 1st ed.; CRC Press: Boca Raton, Florida, United States, 1994; pp. 3-28.
42. Liu C, Wang W, Shen W, Chen T, Hu L, Chen Z. Evaluation of the biocompatibility of a nonceramic hydroxyapatite. *J Endod*. 1997; 23(8): 490-493.
43. Munting E., Verhelpen M., Li F., Vincent A. Contribution of hydroxyapatite coatings to implant fixation. In: *Handbook of Bioactive Ceramics*, 1st ed.; Yamamuro T., Hench, L., Wilson, J.; CRC press: Boca Raton, Florida, United States, 1990; Volume 2, pp. 143–148.
44. Golec TS. The use of hydroxylapatite to coat subperiosteal implants. *J Oral Implantol*. 1985; 12: 21–39.
45. Rabalais ML Jr, Yukna RA, Mayer ET. Evaluation of durapatite ceramic as an alloplastic

implant in periodontal osseous defects. I. Initial six-month results. *J Periodontol.* 1981; 52(11): 680-689.

46. Piecuch JF. Augmentation of the atrophic edentulous ridge with porous replemineform hydroxyapatite (Interpore-200). *Dent Clin North Am.* 1986; 30(2): 291-305.

47. Habraken W, Habibovic P, Epple M, Bohner M. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater.* 2016; 28(2): 69-87.

48. Dorozhkin SV, Epple M. Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates. *Adv Polym Sci.* 2002; 161(1): 3130-3146.

49. Eliaz N, Metoki N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials (Basel)* 2017; 10(4): 334.

50. Jardim RN, Rocha AA, Rossi AM, de Almeida Neves A, Portela MB, Lopes RT, Pires Dos Santos TM, Xing Y, Moreira da Silva E. Fabrication and characterization of remineralizing dental composites containing hydroxyapatite nanoparticles. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2020; 109: 103817.

51. Canillas M, Pena P, de Aza AH, Rodríguez MA. Calcium phosphates for biomedical applications. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio* 2017; 56(3): 91-112.

52. Murugan R, Ramakrishna S. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. *Biomaterials* 2004; 25(17): 3829-3835.

53. P.N. De Aza, A.H. De Aza, S. De Aza. Crystalline bioceramic materials. *Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr.*, 44 (2005), pp. 135-145.

54. Kim MY, Kwon HK, Choi CH, Kim BI. Combined effects of nano-hydroxyapatite and NaF on remineralization of early caries lesion. *Key Eng Mater.* 2007; 1347: 330-332.

55. Safronova TV, Selezneva II, Tikhonova SA, Kiselev AS, Davydova GA, Shatalova TB, Larionov DS, Rau JV. Biocompatibility of biphasic  $\alpha,\beta$ -tricalcium phosphate ceramics in vitro. *Bioact Mater.* 2020; 5(2): 423-427.

56. De Aza RG.  $\alpha$ -Tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomater.* 2011; 7(10): 3536-3546.

57. Wagoner Johnson AJ, Herschler BA. A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. *Acta Biomater.* 2011; 7(1): 16-30.

58. Gelli R, Briccolani-Bandinia L, Pagliaia M, Cardinia G, Ridiab F, Baglioniab P. Exploring the effect of Mg<sup>2+</sup> substitution on amorphous calcium phosphate nanoparticles. *J Colloid Interface Sci.* 2021; 606: 444-453.

59. Eanes ED. Crystal growth of mineral phases in skeletal tissues. *Progr Cryst Growth Character.* 1980; 3: 3–15.
60. Dorozhkin SV. Amorphous calcium (ortho)phosphates. *Acta Biomaterialia* 2010; 6(12): 4457–4475.
61. Luginina M, Orru R, Cao G, Grossin D, Brouillet F, Chevallier G, Thouron C, Drouet C. First successful stabilization of consolidated amorphous calcium phosphate (ACP) by cold sintering: toward highly-resorbable reactive bioceramics. *J Mater Chem B.* 2020; 8: 629-635.
62. Wendler A, Wehling M. The translatability of animal models for clinical development: biomarkers and disease models. *Curr Opin Pharmacol.* 2010; 10(5): 601-606.
63. Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim.* 2011; 45(1): 14-24.
64. Hambright WS, Niedernhofer LJ, Huard J, Robbins PD. Murine models of accelerated aging and musculoskeletal disease. *Bone* 2019; 125: 122-127.
65. An, Y.H. & Freidman, R.J. (1998). *Animal models in orthopedic research* (1st ed.). Boca Raton, FL: CRC Press 1998. pp. 39-57. 622 p.
66. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 1986; (205): 299-308.
67. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater.* 2007; 13: 1-10.
68. Shanks N, Greek R, Greek J. Are animal models predictive for humans?. *Philos Ethics Humanit Med.* 2009; 4: 2.
69. Newman E, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone* 1995; 16(4): 277S-284S.
70. de Kleer V. Development of bone. G. Sumner-Smith (Ed.), *Bone in clinical orthopedics*, W.B. Saunders Co., Philadelphia (2006), pp. 1-80.
71. Pastoureau P, Arlot M, Caulin F, Barlet J, Meunier P, Delmas P. Effects of oophorectomy on biochemical and histological indices of bone turnover in ewes. *J Bone Miner Res.* 1989; 4(1): 58.
72. Maissen O, Eckhardt C, Gogolewski S, Glatt M, Arvinte T, Steiner A, Rahn B, Schlegel U. Mechanical and radiological assessment of the influence of rhTGFbeta-3 on bone regeneration in a segmental defect in the ovine tibia: pilot study. *J Orthop Res.* 2006; 24(8): 1670-1678.
73. Reichert JC, Epari DR, Wullschleger ME, Saifzadeh S, Steck R, Lienau J, Sommerville S, Dickinson IC, Schütz MA, Duda GN, Hutmacher DW. Establishment of a preclinical ovine

model for tibial segmental bone defect repair by applying bone tissue engineering strategies. *Tissue Eng Part B Rev* 2010; 16(1): 93-104.

74. Thorwarth M, Schultze-Mosgau S, Kessler P, Wiltfang J, Schlegel KA. Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 63(11): 1626-1633.

75. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 1998; 139(2): 663-670.

76. Mosekilde L, Kragstrup J, Richards A. Compressive strength, ash weight, and volume of vertebral trabecular bone in experimental fluorosis in pigs. *Calcif Tissue Int*. 1987; 40(6): 318-322.

77. Pecquet Goad ME, Goad DL. Biomedical Material and Devices. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology 2013; 2: 783-806.

78. Thirivikraman G, Madras G, Basu B. In vitro/In vivo assessment and mechanisms of toxicity of bioceramic materials and its wear particulates. *RSC Adv*. 2014; 4(25): 12763.

79. Liu LP, Xiao YB, Xiao ZW, Wang ZB, Li C, Gong X. Toxicity of hydroxyapatite nanoparticles on rabbits. *Journal of hygiene research* 2005; 34(4): 474-476.

80. Ooi JP, Kasim SR, Shaari RB, Saidin NA. In vivo efficacy and toxicity of synthesized nano- $\beta$ -tricalcium phosphate in a rabbit tibial defect model. *Toxicol Res Appl*. 2018; 2: 1-9.

81. Arsenijevic N, Selakovic D, Katanic Stankovic JS, Mihailovic V, Mitrovic S, Milenkovic J, et al. The Beneficial Role of Filipendula ulmaria Extract in Prevention of Prodepressant Effect and Cognitive Impairment Induced by Nanoparticles of Calcium Phosphates in Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2021; 2021: 6670135.

82. Jin Y, Liu X, Liu H, Chen S, Gao C, Ge K, Zhang C, Zhang J. Oxidative stress-induced apoptosis of osteoblastic MC3T3-E1 cells by hydroxyapatite nanoparticles through lysosomal and mitochondrial pathways. *RSC Adv*. 2017; 7: 13010-13018.

83. Liu Z, Xiao Y, Chen W, Wang Y, Wang B, Wang G, Xu Xl, Tang R. Calcium phosphate nanoparticles primarily induce cell necrosis through lysosomal rupture: the origination of material cytotoxicity. *J Mater Chem B*. 2014; 2: 3480-3489.

84. Turkez H, Yousef MI, Sönmez E, Togar B, Bakan F, Sozio P, Stefano AD. Evaluation of cytotoxic, oxidative stress and genotoxic responses of hydroxyapatite nanoparticles on human blood cells. *J Appl Toxicol*. 2014; 34(4): 373-379.

85. Mosa IF, Yousef MI, Kamel M, Mosa OF, Helmy Y. The protective role of CsNPs and CurNPs against DNA damage, oxidative stress, and histopathological and immunohistochemical alterations induced by hydroxyapatite nanoparticles in male rat kidney. *Toxicol Res*. 2019; 8(5):

741-753.

86. Sonmez E., Cacciatore I., Bakan F., Turkez H., Mohtar Y., Togar B., Stefano A. Toxicity assessment of hydroxyapatite nanoparticles in rat liver cell model in vitro. *Hum Exp Toxicol.* 2016; 35(10): 1073–1083.

87. Yousef MI, Abd HH, Helmy YM, Kamel MA. Synergistic effect of curcumin and chitosan nanoparticles on nano-hydroxyapatite-induced reproductive toxicity in rats. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2021; 28(8): 9362-9376.

88. Mishra BB, Tiwari VK. Natural products: an evolving role in future drug discovery. *Eur J Med Chem.* 2011; 46(10): 4769-4807.

89. Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33(2): 179-189.

90. Jaiswal YS, Williams LL. A glimpse of Ayurveda - The forgotten history and principles of Indian traditional medicine. *J Tradit Complement Med.* 2016; 7(1): 50-53.

91. Wagner H. Natural products chemistry and phytomedicine in the 21st century: New developments and challenges. *Pure Appl Chem.* 2005; 77: 1–6.

92. Khanna P, Ong C, Bay BH, Baeg GH. Nanotoxicity: An Interplay of Oxidative Stress, Inflammation and Cell Death. *Nanomaterials (Basel)* 2015; 5(3): 1163-1180

93. Kalinichenko SG, Matveeva NY, Kostiv RY, Edranov SS. The effect of calcium phosphate biodegradable coatings of titanium implants on cell differentiation and apoptosis in rat bone tissue after experimental fracture. *Biomed Mater Eng.* 2021; 32(1): 53-62.

94. Carochi M, Ferreira IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol.* 2013; 51:15-25.

95. Katanić J, Boroja T, Stanković N, Mihailović V, Mladenović M, Kreft S, Vrvic MM. Bioactivity, stability and phenolic characterization of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. *Food Funct.* 2015; 6(4): 1164-1175.

96. Katanić J, Matić S, Pferschy-Wenzig EM, Kretschmer N, Boroja T, Mihailović V, Stanković V, Stanković N, Mladenović M, Stanić S, Mihailović M, Bauer R. *Filipendula ulmaria* extracts attenuate cisplatin-induced liver and kidney oxidative stress in rats: In vivo investigation and LC-MS analysis. *Food Chem Toxicol.* 2017; 99: 86-102.

97. Barros L, Cabrita L, Boas MV, Carvalho AM, Ferreira ICFR. Chemical, biochemical and electrochemical assays to evaluate phytochemicals and antioxidant activity of wild plants. *Food Chem.* 2011; 127(4): 1600–1608.

98. Harbourne N, Marete E, Jacquier JC, O’Riordan D. Stability of phytochemicals as sources of

anti-inflammatory nutraceuticals in beverages – a review. *Food Res Int.* 2013; 50(2): 480-486.

99. Samardžić S, Arsenijević J, Božić D, Milenković M, Tešević V, Maksimović Z. Antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotective activity of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula vulgaris* Moench. *J Ethnopharmacol.* 2018; 213: 132-137.

100. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 2011; 82(4): 513–523.

101. Cwikla C, Schmidt K, Matthias A, Bone KM, Lehmann R, Tiralongo E. Investigations into the antibacterial activities of phytotherapeutics against *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. *Phytother Res.* 2010; 24(5): 649-656.

102. Scepanovic R, Selakovic D, Katanic Stankovic JS, Arsenijevic N, Andjelkovic M, Milenkovic J, Milanovic P, Vasovic M, Jovicic N, Rosic G. The Antioxidant Supplementation with *Filipendula ulmaria* Extract Attenuates the Systemic Adverse Effects of Nanosized Calcium Phosphates in Rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2021; 2021: 8207283.

103. Epple M. Review of potential health risks associated with nanoscopic calcium phosphate. *Acta Biomater.* 2018;77:1-14.

104. Nemenqani D, El-Gharib O, Ahmed AM, Baiuomy AR. The Protective Effects of Antioxidant (Vitamin C) Against Hepatic Oxidative Damage Induced by Zinc Oxide Nanoparticles . *Int Res J App Basic Sci.* 2015; 9: 502-509.

105. Xu J, Xu P, Li Z, Huang J, Yang Z. Oxidative stress and apoptosis induced by hydroxyapatite nanoparticles in C6 cells. *J Biomed Mater Res A* 2012; 100(3): 738-745.

106. Xu Z, Liu C, Wei J, Sun J. Effects of four types of hydroxyapatite nanoparticles with different nanocrystal morphologies and sizes on apoptosis in rat osteoblasts. *J Appl Toxicol.* 2012; 32(6): 429-435.

107. Sun J; Ding T. p53 reaction to apoptosis induced by hydroxyapatite nanoparticles in rat macrophages. *J Biomed Mater Res A* 2009; 88(3): 673-679.

108. Li G, Huang J, Li Y, Zhang R, Deng B, Zhang J, Aoki H. In vitro study on influence of a discrete nano-hydroxyapatite on leukemia P388 cell behavior. *Biomed Mater Eng.* 2007; 17(5): 321-327.

109. Hart SE. Assessment of Renal Function. In: *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*, Hock F. (eds), Springer, Berlin, Heidelberg, 2015, pp. 1-44.

110. Haut LL, Alfrey AC, Guggenheim S, Buddington B, Schrier N. Renal toxicity of phosphate in rats. *Kidney Int.* 1980; 17(6): 722-731.

111. Chen Q, Xue Y, Sun J. Hepatotoxicity and liver injury induced by hydroxyapatite nanoparticles. *J Appl Toxicol.* 2014; 34(11): 1256-1264.

112. Paraš S, Trišić D, Mitrović AO, Prokić B, Drobne D, Živković S, Jakanović V. Toxicological Profile of Nanostructured Bone Substitute Based on Hydroxyapatite and Poly(lactide-co-glycolide) after Subchronic Oral Exposure of Rats. *Nanomaterials* 2020; 10(5): 918.
113. Liu X, Sun J. Endothelial cells dysfunction induced by silica nanoparticles through oxidative stress via JNK/P53 and NF-kappaB pathways. *Biomaterials* 2010; 31(32): 8198-8209.
114. Ong C, Lee QY, Cai Y, Liu X, Ding J, Yung LY, Bay BH, Baeg GH. Silver nanoparticles disrupt germline stem cell maintenance in the *Drosophila* testis. *Sci Rep.* 2016; 6: 20632.



# СКРАЋЕНИЦЕ

**CaPs** – калцијумфосфати

**HA** – хидроксиапатит

**ACP** – аморфни калцијум фосфат

**TCP** – трикалцијум фосфат

**FU** – *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim

**ROS** – реактивне врсте кисеоника (енгл. reactive oxygen species)

**NF-κB** – нуклеарни фактор κB (енгл. nuclear factor κB)

**AST** – аспартат трансминаза

**ALT** – аланин трансминаза

**ALP** – алкална фосфатаза

**CAT** – каталаза

**SOD** – супероксид дисмутаза

**GSH** – глутатион

**LH** – лутеинизирајући хормон

## Биографија

Др Радомир Шћепановић је рођен у Београду 1984. године. Основну школу и гимназију је завршио у Београду. Стоматолошки факултет у Београду је завршио 2012. године. Лекарски стаж је завршио на ВМА 2013. године. Курс за резервне официре је завршио у тренинг центру санитетске службе у Београду 2014. године, и исте године је примљен у активну војну службу у Гарду као санитетски потпоручник. Специјалистичке академске студије из оралне имплантологије завршио је 2015. године на Стоматолошком факултету у Београду. Докторске академске студије уписао 2016. године на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, а докторски испит је одбранио 2018. године. Специјализацију из оралне хирургије завршио 2021. године на Стоматолошком факултету у Београду. Аутор и коатор је више научних радова у домаћим и међународним часописима. Изабран је за делегата ВМА у Стоматолошкој комори Србије 2021. године, као и за судију у Суду части другог степена Стоматолошке коморе Србије, односно за председника Суда части другог степена Стоматолошке коморе Србије. Током војне каријере је одликован значком, два пута спомен медаљом, и ванредно унапређен у чин капетана прве класе од Министра одбране. Ожењен је и отац једног детета.

## Библиографија

1. Todorović D, Stojanović M, Šćepanović Lj, Mitrović D, Šćepanović V, **Šćepanović R**, Ilić S, Šćepanović T, Đurić D. Roles of sulfur-containing amino acids in gastrointestinal physiology and pathophysiology. *Vojnosanit pregl.* 2020 OnLine-First (00):37-37 doi.org/10.2298/VSP191009037T (M23, IF=0,272)
2. Todorović D, Stojanović M, Šćepanović Lj, Mitrović D, Šćepanović V, **Šćepanović R**, Šćepanović T, Labudović-Borović M, Dragutinović V, Borozan N, Djuric D. Effects of subchronic methionine stimulation on oxidative status and morphological changes in the rat ileum. *Gen. Physiol. Biophys.* 2019; 38: 535-544. doi: 10.4149/gpb\_2019033 (M23, IF=1,309)
3. Šćepanović V, Tasić G, Repac N, Nikolić I, Janićijević A, Todorović D, Stojanović M, **Šćepanović R**, Mitrović D, Šćepanović T, Borozan S, Šćepanović L. The role of oxidative stress as a risk factor for rupture of posterior inferior cerebellar artery aneurysms. *Mol Biol Rep.* 2018; 45(6): 2157-2165. doi: 10.1007/s11033-018-4374-6.. (M23, IF=1,889)
4. Stojanović M, Šćepanović L, Todorović D, Mitrović D, Šćepanović V, **Šćepanović R**, Ilić S, Šćepanović T, Borović ML, Milićević Ž, Dragutinović V, Borozan S, Lalić I, Despotović S, Djuric D. Suppression of methionine-induced colon injury of young rats by cysteine and N-acetyl-L-cysteine. *Mol Cell Biochem.* 2018; 440(1-2): 53-64. doi: 10.1007/s11010-017-3155-1. (M23, IF=2,669)
5. Stojanović M, Šćepanović Lj, Mitrović D, Šćepanović V, **Šćepanović R**, Djuric M, Ilić S, Šćepanović T, Djuric D. Different pathways involved in stimulatory effects of homocysteine on rat duodenal smooth muscle. *Acta Vet-Beograd.* 2017; 67 (2): 254-270. DOI:10.1515/acve-2017-0021 (M22, IF=0,741)
6. Stojanovic M, Šćepanović Lj, Bosnić O , Mitrović D, Jozanov-Stankov O, Šćepanović V, **Šćepanović R**, Stojanović T, Ilić S, Djuric D. The effects of the acute administration of D,L-homocysteine thiolactone on antioxidative status of rat intestine and liver. *Acta Vet-Beograd.* 2016; 66(1): 26-36. DOI: 10.1515/acve-2016-0002 (M23, IF= 0,375)
7. **Šćepanovic R**, Selaković D, Katanić Stanković J, Arsenijević J, Andjelković M, Milenković J, Milanović P, Vasović M, Nemanja Jovičić N and Rosić G. The Antioxidant Supplementation with Filipendula ulmaria Extract Attenuates the Systemic Adverse Effects of Nanosized Calcium Phosphates in Rats. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2021, Article ID 8207283, 16 pages , <https://doi.org/10.1155/2021/8207283> (M21, IF= 6,543)
8. Arsenijević N, Milenković J, Milanović P, Arnaut A, Jovanović M, Veličkovic S, **Šćepanovic R** and Selaković D. Does an alteration in nociceptive response to mineral components of dental composites involve changes in oxidative status? A brief report. 2021. *Ser J Exp Clin Res.* 2021. ( M51)

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Радомир Шћепановић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Утицај антиоксидантне суплементације екстрактом биљке Filipendula  
ulmaria на манифестације системске токсичности наночестица  
калцијумфосфата код пацова

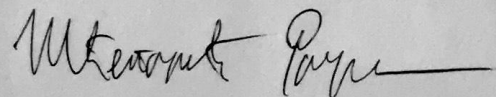
која је одбрањена на Факултету медицинских наука  
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

*Овом Изјавом такође потврђујем:*

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 24.12.2021. године,

Радомир Шћепановић  
потпис аутора



**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Радомир Шћепановић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Утицај антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula*  
*ulmaria* на манифестације системске токсичности наночестица  
калцијумфосфата код пацова

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

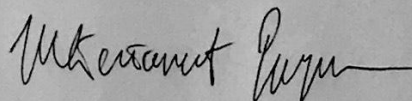
припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, 24.12.2021. године,

Радомир Шћепановић

потпис аутора



---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>