



UNIVERZITET U NIŠU  
MEDICINSKI FAKULTET



**Kosta M. Todorović**

**EFIKASNOST KOENZIMA Q10 I KURKUMINA  
ENKAPSULIRANIH U NANOLIPOZOME KOD  
ZARASTANJA MEKIH TKIVA NAKON  
EKSTRAKCIJE ZUBA: EKSPERIMENTALNA  
STUDIJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2018.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF MEDICINE



**Kosta M. Todorović**

**EFFICIENCY OF NANOLIPOSOME-  
ENCAPSULATED COENZYME Q10 AND  
CURCUMIN IN SOFT TISSUE HEALING  
AFTER TOOTH EXTRACTION: AN  
EXPERIMENTAL STUDY**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2018.

## Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:	Prof. dr Goran Jovanović, redovni profesor, Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet
Naslov:	Efikasnost koenzima Q <sub>10</sub> i kurkumina enkapsuliranih u nanolipozome kod zarastanja mekih tkiva nakon ekstrakcije zuba: eksperimentalna studija
Rezime:	<p>Proces zarastanja rana posle ekstrakcije zuba je od velikog značaja u stomatološkoj praksi. Primena brojnih antioksidanasa može značajno poboljšati ovaj proces i u velikoj meri doprineti kvalitetu oporavka pacijenata posle ove inetrvencije. U eksperimentalnoj studiji pacovima Wistar soja su ekstrahirani gornji incizivi, posle čega su na ekstrakcione rane aplikovani rastavori koenzima Q<sub>10</sub> i kurkumina u slobodnoj formi i formi enkapsuliranoj u nanolipozome. Ekstrakcione rane bile su tretirane navedenim rastvorima u trajanju od 21 dana. Upotreba antioksidanasa kao što su koenzim Q<sub>10</sub> i kurkumin značajno je doprinela poboljšanju toka zarastanja rana posle ekstrakcije zuba kod eksperimentalnih životinja. Posebno treba istaći da su najbolji rezultati dobijeni lokalnom aplikacijom koenzima Q<sub>10</sub> i kurkumina enkapsuliranih u nanolipozome. Ovakva njihova primena dovela je do značajnog smanjenja inflamacije, kao i ubrzanja ćelijske proliferacije koja je neophodna za regeneraciju oštećenog tkiva. Takođe, jedan od ciljeva izrađene doktorske disertacije bila je analiza ekspresije osteopontina, glikoproteina sa važnim ulogama u inflamaciji i biomineralizaciji. Navedena imunohistohemijska analiza pokazala je značajno manju ekspresiju u tkivima tretiranim antioksidansima enkapsuliranim u nanolipozome u odnosu na kontrolnu i ostale eksperimentalne grupe životinja. Analiza nivoa parametara oksidativnog stresa (MDA, AOPP, katalaza) pokazala je da je primena antioksidanasa u obe forme u značajnoj meri sprečila oštećenja izazvana nastalih produkcijom kiseoničkih vrsta. Svi rezultati dobijeni u doktorskoj disertaciji prikazani su tabelarno, grafički i dokumentovani slikama patohistološke analize tkiva. Dobijeni rezultati izrađene doktorske disertacije mogu poslužiti kao polazna osnova za primenu ovih antioksidanasa u kliničkoj praksi za ubrzavanje procesa zarastanja rana kao i zarad smanjenja pojave komplikacija posle ekstrakcije zuba.</p>
Naučna oblast:	Stomatologija
Naučna disciplina:	Oralna hirurgija
Ključne reči:	Zarastanje rane, koenzim Q <sub>10</sub> , kurkumin, nanolipozomi, osteopontin, oksidativni stres
UDK:	616.314-089.87-001-08(043.3)
CERIF klasifikacija:	B730 Odontologija, stomatologija
Tip licence kreativne zajednice:	<b>CC BY-NC-ND</b>

## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Prof. dr Goran Jovanović, full professor, University of Niš, Faculty of Medicine
Title:	Efficiency of nanoliposome-encapsulated coenzyme Q <sub>10</sub> and curcumin in soft tissue healing after tooth extraction: An experimental study
Abstract:	<p>The process of wound healing has a high significance in dental practice. The application of numerous antioxidants can significantly improve the process and greatly contribute to the quality of patient recovery after the intervention. In the experimental study with Wistar rats, the upper incisors were extracted and after that the solutions of coenzyme Q<sub>10</sub> and curcumin in its free and nanoliposome-encapsulated form were applied. The extraction wounds were treated with the stated solutions for 21 days. The use of antioxidants such as Q<sub>10</sub> and curcumin has significantly contributed to the improvement of the course of wound healing during teeth extraction in experimental animals. It needs to be emphasized that the best results were obtained by local application of coenzyme Q<sub>10</sub> and nanoliposome-encapsulated curcumin. This application has reduced inflammation and accelerated cellular proliferation which is necessary for regeneration of damaged tissue. In addition, one of the aims of the doctoral thesis was to analyze the expression of osteopontin, a glycoprotein with important roles in inflammation and biomineralization. The immunohistochemical analysis showed a significantly lower expression in the tissues treated with nanoliposome-encapsulated antioxidants, compared to the control and other experimental groups of animals. The analysis of the level of oxidative stress parameters (MDA, AOPP, catalysis) showed that the application of antioxidants in both forms greatly contributed to the prevention of damage caused by oxygen bond production. All the results obtained in the doctoral thesis are presented in tables, graphs and are documented with images of pathohistological tissue analysis. The obtained results of the thesis can be used as a starting point in the application of these antioxidants in clinical practice in order to accelerate the process of wound healing, as well as to reduce the development of complications after teeth extraction.</p>
Scientific Field:	Stomatology
Scientific Discipline:	Oral surgery
Key Words:	Wound healing, coenzyme Q <sub>10</sub> , curcumin, nanoliposomes, osteopontin, oxidative stress
UDC:	616.314-089.87-001-08(043.3)
CERIF Classification:	B730 Odontology, stomatology
Creative Commons License Type:	<b>CC BY-NC-ND</b>

## Spisak najčešće korišćenih skraćenica

AOPP – uznapredovali produkti oksidacije proteina

CAT – katalaza

CoQ<sub>10</sub> – koenzim Q<sub>10</sub>

CRP – C-reaktivni protein

DAB – 3, 3'-diaminobenzidin

DAMP – molekularni putevi povezani sa povredama

ECM – ekstracelularni matriks

EDTA – etilen-diamin-tetraacetatne kiselin

EGF – epidermalni factor rasta

FGF – fibroblastni factor rasta

FGF-2 – fibroblastni factor rasta 2

HE – hematoksilin i eozin

HGF – hepatocitni factor rasta

HIF – hipoksija inducibilni faktor

IGF – insulinu sličan factor rasta

IL-1 – interleukin-1

IL-4 – interleukin 4

IL-5 – interleukin 5

IL-6 – interleukin 6

IL-10 – interleukin 10

IL-13 – interleukin 13

IL-23 – interleukin 23

IFN- $\gamma$  – interferon gama

IRF – interferon regulatorog faktora

KU – kurkumin

M1 makrofagi – klasično aktivirani makrofagi

M2 makrofagi – alternativno aktivirani makrofagi

MDA – malondialdehid

MMP-1 – matriks metaloproteinaza-1

MMP-9 – matriks metaloproteinaza-9

MMP-10 – matriks metaloproteinaza-10

NF-(k)B – nuklearni transkripcioni faktor kappa B

PAMP – molekularni putevi povezani sa patogenima

PBS – fosfati pufer

PDGF – trombocitni faktora rasta

PRR – receptorima posredovai putevi

ROS – reaktivne vrste kiseonika

TGF – transformišući factor rasta

TNF- $\alpha$  – tumor nekrosis faktora  $\alpha$

VEGF – vaskularni endotelni factor rasta

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	9
2. PREGLED LITERATURE .....	11
2.1. Zarastanje rana .....	11
2.1.1. Hemostaza .....	13
2.1.2. Inflamacija .....	14
2.1.3. Proliferacija .....	23
2.1.4. Maturacija .....	24
2.1.5. Koštana regeneracija.....	24
2.2. Uloga molekula ekstracelularnog matriksa u procesu zarastanja.....	26
2.3. Zarastanje ekstrakcionih rana .....	26
2.3.1. Opšti (sistemski) faktori .....	27
2.3.2. Lokalni faktori .....	27
2.4. Komplikacije ekstrakcionih rana .....	29
2.5. Dosadašnje terapijske metode .....	31
2.6. Antioksidansi i nanolipozomi.....	33
2.6.1. Kurkumin - opšta svojstva i osobine .....	33
2.6.2. Koenzim Q <sub>10</sub> - opšta svojstva i osobine.....	35
2.6.3. Nanolipozomi .....	37
3. CILJEVI RADA.....	40
4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA .....	41
4.1. <i>In vivo</i> istraživanje na animalnom modelu pacova .....	41
4.1.1. Eksperimentalni protokol .....	41
4.1.2. Priprema rastvora za lokalnu primenu.....	44
4.2. Obrada tkiva .....	44
4.2.1. Obrada tkiva za patohistološku analizu .....	44
4.2.2. Imunohistohemijska analiza .....	48
4.2.3. Određivanje nivoa oksidativnog stresa.....	49
4.2.3.1. Određivanje koncentracije malondialdehida .....	49

4.2.3.2. Određivanje koncentracije uznapredovalih proteina u homogenatu .....	49
4.2.3.3. Određivanje aktivnosti katalaze.....	49
4.2.3.4. Određivanje količine proteina .....	50
4.3. Statistička obrada podataka .....	50
5. REZULTATI.....	51
5.1. Patohistološka analiza .....	51
5.1.1. Patohistoška i imunohistohemijska analiza isečaka mekog tkiva rane sedam dana posle ekstrakcije zuba .....	51
5.1.2. Patohistoška i imunohistohemijska analiza isečaka mekog tkiva rane četrnaest dana posle ekstrakcije zuba .....	62
5.1.3. Patohistoška i imunohistohemijska analiza isečaka mekog tkiva rane dvadeset i jedan dan posle ekstrakcije zuba .....	70
5.2. Rezultati analize markera oksidativnog stresa u homogenatu mekog tkiva koje okružuje postekstrakcionu ranu.....	78
5.2.1. Rezultati nivoa AOPP u homogenatu mekog tkiva koje okružuje ranu .....	78
5.2.2. Rezultati nivoa MDA u homogenatu mekog tkiva koje okružuje ranu .....	80
5.2.3. Rezultati aktivnosti CAT u homogenatu mekog tkiva koje okružuje ranu .....	83
6. DISKUSIJA .....	87
7. ZAKLJUČCI.....	100
8. LITERATURA .....	103
BIOGRAFIJA AUTORA.....	119



## **1. UVOD**

Narušavanje integriteta tkiva, delovanjem akutnog ili hroničnog faktora, aktivnije višestruke dinamične i visoko organizovane procese sa ciljem regeneracije tkiva i obnavljanja njegove funkcije. Ovi procesi moraju biti dobro koordinisani, u smislu redosleda i intenziteta trajanja, kako bi se obezbedila potpuna biofiziološka regeneracija ćelija i tkiva, a samim tim i izbegle komplikacije u toku procesa njihove reparacije.

Samo pojedina tkiva imaju sposobnost potpune regeneracije, kako u smislu morfološke tako i kompletne obnove funkcije. Step en ćelijskog oštećenja važan je parametar koji može pretvoriti reverzibilni u ireverzibilni tok obnove tkiva. Tako se u hipoksičnim uslovima uvek razvija nekroza, koja umesto regeneracijom, rezultira formiranjem fibroznog ožiljnog tkiva.

Veliki broj dosadašnjih istraživanja usmeravan je na praćenje procesa zarastanja rane i ispitivanje faktora koji na njega utiču. Delovanjem na pojedine faze može se uticati na skraćanje vremena zarastanja i smanjenje komplikacija, sa pravilnom obnovom tkiva. Komplikacije koje mogu nastati u toku zarastanja rane prouzrokuju trenutno ili trajno narušenje kvaliteta života, a iziskuju i visoke ekonomske troškove, a neretko i skupe i dugotrajne tretmane. Mnoga istraživanja su usmeravana u cilju razvoja i pronalaska raznih metoda i agenasa koji bi pospešili regeneraciju i reparaciju tkiva, što bi dovelo do smanjenja komplikacija. Do sada je dokazan pozitivan efekat polarizovane svetlosti i lasera male snage na proces zarastanja rane, kao i lokalna i sistemska primena antioksidanasa i faktora rasta. Međutim, primećeni su izvesni nedostaci koji se pre svega odnose na ograničenje i/ili slabu kontrolu doziranja supstance na mestu primene, njihovu brzu razgradnju i pojavu toksičnih efekata, naročito kod primene većih koncentracija aktivne sustance na mestu delovanja.

Razvoj novih saznanja na polju molekularne medicine, tkivnog inženjeringa i nanotehnologije, mogao bi dovesti do uspešnog prevazilaženja ovih nedostataka i značajnih rezultata u stimulaciji zarastanja rane. U poslednje vreme lipozomi su

privukli veliku pažnju naučne javnosti kao mogući nosioci brojnih bioaktivnih supstanci (Kocić i sar., 2017).

Njihove nanoforme - **nanolipozomi** su se zbog svoje sposobnosti da povećaju rastvorljivost, poboljšaju biodostupnost, unaprede kontrolu otpuštanja i omogućće precizno ciljanje aktivne supstance pokazali kao izuzetno efikasni u svrhu bržeg oporavka posle mehaničke traume.

Iz tog razloga nameće se, ne samo kao istraživačka obaveza već i kao praktična potreba, ispitivanje ovih supstanci u svetlu novih naučnih i tehnoloških dostignuća. Enkapsulacija pojedinih antioksidanasa poput **koenzima Q<sub>10</sub>** i **kurkumina** u nanolipozome kao i njihova lokalna primena i uticaj na proces zarastanja rane posle ekstrakcije zuba, u do sada dostupnoj literaturi nisu bili predmet istraživanja.

## 2. PREGLED LITERATURE

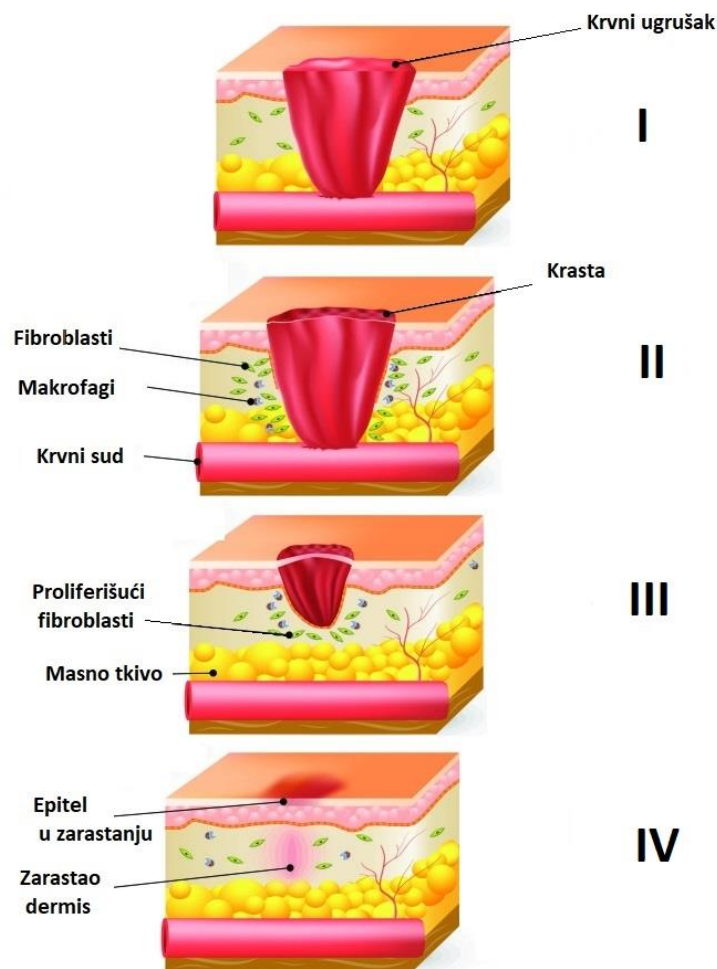
### 2.1. Zarastanje rana

Rana predstavlja prekid kontinuiteta tkiva nastao dejstvom traume. Oštećenje tkiva može nastati dejstvom fizičkog, hemijskog i mehaničkog agensa. Bez obzira na etiologiju nastanka oštećenja tkiva, organizam se bori da zaustavi krvarenje, spreči infekciju, uspostavi integritet tkiva i funkciju. Rane u organizmu mogu zarastati na dva načina: primarno i sekundarno. Oba tipa zarastanja u osnovi su slična.

I. Primarno zarastanje „*sanatio per primam intentionem*“ podrazumeva zarastanje gde su ivice rane glatke i na malom međusobnom rastojanju, bez većeg oštećenja tkiva, prisustva gnoja i supuracije (Kujath i Michelsen, 2008). Može se reći da je preduslov za primarno zarastanje aseptična, sveža rana, tako da se uglavnom poistovećuje sa ranom nastalom hirurškom incizijom kod koje su ivice rane povezane suturom, odnosno hirurškim šavom. Inflamacija tkiva je veoma slabo izražena. Ovaj tip rane zarasta uglavnom u roku od 6-8 dana u nivou neoštećenog okolnog tkiva, bez defekta, nakon čega dolazi do formiranja linearnog ožiljka.

II. Sekundarno zarastanje „*sanatio per sekundam intentionem*“ nastaje kod rana sa većim oštećenjem i defektom tkiva, gde je nemoguće međusobno približiti i spojiti ivice rane. Rizik od infekcije kod ovog tipa zarastanja je značajno veći zbog većeg gubitka tkiva. Infekcija se najčešće javlja neposredno nakon traume. Proces zarastanja je spor, prolongiran, može trajati i nekoliko meseci, uz formiranje veće količine granulacionog tkiva i ožiljka nepravilnog oblika (Nwomeh i sar., 1998). Oblik i veličina ožiljka zavisi od vrste povređenog tkiva i opšteg stanja organizma. Tako, prisustvo sistemskih stanja i bolesti poput dijabetesa, kaheksije, vitaminskog deficita, izloženosti jonizujućem zračenju, veći gubitak krvi i sl., svakako će prolongirati zarastanje i uticati na razvoj ožiljka sa većim defektom tkiva. Sekundarno zarastanje karakteriše postekstrakcionu ranu ili oralno hirurške intervencije koje za posledicu imaju gubitak kosti.

Normalan proces zarastanja rane prolazi kroz nekoliko precizno programiranih i preklapajućih faza: **hemostazu, inflamaciju, proliferaciju, maturaciju i koštanu regeneraciju**. Faze zarastanja nisu jasno razgraničene i vremenski strogo kontrolisane, već se često preklapaju. Svaka promena u njihovom redosledu zbivanja, prekid ili prolongiranje pojedinih faza, može prouzrokovati komplikacije i formiranje hroničnih rana (Delavary i sar. 2011). Prelaz između faza uglavnom zavisi od maturacije i diferencijacije mastocita, fibroblasta, keratinocita i makrofaga, koji ujedno igraju i ključnu ulogu u procesu zarastanja (Rodero i Khosrotehrani, 2010).



**Slika 1.** Faze zarastanja rane, I – Hemostaza, II – Inflamacija, III – Proliferacija i IV – Sazrevanje.

### 2.1.1. Hemostaza

Hemostaza je proces koji nastaje odmah posle povrede tkiva, sa ciljem sprečavanja gubitka krvi ili zadržavanja krvi unutar povređenog krvnog suda. To je prvi stadijum u procesu zarastanja rane koji uključuje vazokonstrikciju krvnih sudova, adheziju i agregaciju trombocita, te formiranje koaguluma. Traje u proseku 15 minuta. Mnogi sistemi učestvuju u hemostazi - zidovi krvnih sudova, trombociti, svi faktori koji učestvuju u formiranju koaguluma, uključujući fibrinogen, fibrinolitički i fagocitni sistem (Wozniak i sar., 2017). Ključnu ulogu u formiranju ugruška imaju endotelne ćelije krvnih sudova, koje u normalnim uslovima lučenjem trombomodulina i heparinu sličnog molekula, sprečavaju zgrušavanje krvi (Novak i sar., 2010). Prilikom povrede krvnog suda, ove ćelije prestaju sa sekrecijom inhibitora koagulacije i počinju da sekretuju von Willebrandov faktor, koji započinje proces hemostaze.

Povreda krvnog suda deluje kao okidač za produkciju trombina, pod čijim uticajem nastaje konverzija intravaskularnog rastvorljivog fibrinogena u nerastvorljiv fibrin. Posle konverzije formira se provizorni matriks sastavljen od fibrina, fibronektina poreklom iz plazme i pojedinih proteina i komponenata ekstracelularnog matriksa (ECM), poput trombospondina i fibronektina (Wozniak i sar., 2017). Nastali krvni koagulum pospešuje ekstravaskularnu migraciju, pre svega trombocita, a kasnije i leukocita. U prvih nekoliko minuta nakon traume, dolazi do aktiviranja inflamatornih ćelija, degranulacije trombocita i degradacije bakterijskih produkata. Ovo deluje kao okidač za otpuštanje proinflamatornih citokina i brojnih faktora rasta (TGF- $\beta$ , PDGF, EGF, FGF) od strane ćelija okolnog tkiva i ugruška (Dedej i sar., 2013). Granule koje se nalaze unutar samih trombocita sadrže brojne medijatore koagulacije krvi. U delta granulama trombocita nalaze se molekuli male mase koji potenciraju aktivaciju trombocita (ADP, serotonin, tromboksan, kalcijum), dok alfa granule sadrže velike molekule polipeptidnih lanaca (fibrinogen, von Willebrandov factor), koji pospešuju hemostazu (Wozniak i sar., 2017).

### 2.1.2. *Inflamacija*

Neposredno po zaustavljanju krvarenja, 5 do 6 sati nakon povrede, razvija se akutna infamacija koja se karakteriše migracijom inflamatornih ćelija, pre svega neutrofila, makrofaga i limfocita (Campos i sar., 2008). Ključna uloga neutrofila je eliminacija mikroorganizama, nekrotičnog sadržaja i ostalog ćelijskog debrisa nastalog oštećenjem tkiva. Međutim, ove ćelije su takođe odgovorne za nastanak reaktivih vrsta kiseonika (engl. ROS - *reactive oxygen species*) i produkciju proteaza, koje dovode do kolateralnih oštećenja tkiva i time potencijalno prolongiraju proces regeneracije (Gurtner i sar., 2008).

Uloga makrofaga u procesu zarastanja je višestruka. U ranoj fazi inflamacije, otpuštanjem citokina oni stimulišu imuni odgovor tako što aktiviraju leukocite i izazivaju njihovu migraciju na mesto povrede. Pored ovoga, makrofagi vrše i eliminaciju nekrotičnih inflamatornih ćelija (neutrofila), stvarajući time povoljne uslove za prelazak inflamatorne u proliferativnu fazu regeneracije. Istovremeno dolazi i do tranzicije njihovog fenotipa, što stimuliše keratinocite, fibroblaste i angiogenezu, čime definitivno proces zarastanja ulazi u proliferativnu fazu (Mosser i Edwards, 2008).

Jedan od prvih koji je prepoznao značaj inflamatorne faze u procesu zarastanja rane jeste John Hunter još pre 200 godina (Li i sar., 2007). Povreda tkiva je glavni inicijator akutnog inflamatornog odgovora. Pojedine supstance koje se oslobađaju od strane nekrotičnih ćelija, dovode do aktivacije lokalnog, regionalnog i sistemskog inflamatornog odgovora (Broughton i sar., 2006).

Brojne studije pokazale su da je upravo inflamatorna faza u toku reparacije i regeneracije usko povezana za razvojem ožiljnog tkiva (Larson i sar., 2010). U prilog ovome govori i činjenica da embrionalna tkiva, kod kojih izostaje inflamatorna faza, uvek zarastaju ožiljkom, za razliku od adultnih, kod kojih je kompletna regeneracija moguća. Inflamacija je osnovni mehanizam koji vodi u dalji tok zarastanja rane kroz faze i koji direktno utiče na patofiziološke mehanizme odgovorne za razvoj brojnih komplikacija (Del Rosso, 2011).

Očigledno je neophodno proširiti standardni pogled na inflamaciju, kao reakciju na povredu ili infekciju, obzirom da su novim saznanjima o patofiziološkim mehanizmima ove faze, razvijeni novi potencijali za dijagnostički i terapijski pristup, kao i prevazilaženje mogućih komplikacija (Singh i sar., 2013).

Smatra se da komunikacija i interakcija između krvi i intersticijskog prostora ima ključnu ulogu u posttraumatskom inflamatornom odgovoru. Ova pretpostavka se bazira na činjenici da brojne komponente krvi napuštaju intravaskularni prostor i migriraju u intersticijum, gde igraju glavnu ulogu u inflamatornim reakcijama, dok endotel predstavlja medijator između ove dve sredine (Li i sar., 2007).

Posttraumatski akutni inflamatorni odgovor sastoji se iz: **nervne, imune i endokrine** faze.

#### 2.1.2.1. Nervna faza inflamacije (imedijatna, inicijalna, progresivna oksigenacija)

Nastupa odmah nakon povrede tkiva. U ovoj fazi dominiraju senzorne (bol i analgezija) i motoričke reakcije (kontrakcija i relaksacija).

Bol nastaje kao odgovor na oštećenje tkiva. Stres se javlja istovremeno i predstavlja eferentni neuralni odgovor somatskog motornog i autonomnog nervnog sistema na bolnu senzaciju. Simpatički i parasimpatički nervni sistem učestvuju u akutnom inflamatornom odgovoru (Oschman i sar., 2015). U najranijoj fazi inflamatornog odgovora, pod uticajem stresa u krv se oslobađaju brojne supstance, poput kortikotropina, aldosterona, biogenih amina i glukagona, koje će se zbog povećane permeabilnosti krvnih sudova ubrzo naći akumulirane u intersticijskom tkivu (Slavich i Irwin, 2014).

Aktivacija ranog motornog mehanizma ogleda se u kontrakciji glatkih mišićnih vlakana krvnih sudova na mestu povrede. Ovaj vazomotorni odgovor doprinosi razvoju ishemije, dovodeći do lokalne i sistemske preraspodele cirkulišuće krvi. Intenzitet i vreme trajanja ishemije do nastanka reperfuzije, odlučiće dalju evoluciju inflamatornog odgovora (Aller i sar., 2007). Ishemiju prati razvoj ćelijskog edema. Već je poznato da se i najmanje fluktuacije u ćelijskoj hidrataciji i volumenu ponašaju kao potencijalni

signal za promenu metabolizma i ekspresiju gena, pa se tako i ćelijski edem smatra okidačem anaboličke aktivnosti (Häussinger, 1996).

U kasnijem periodu nastaje vazodilatacija i reperfuzija na mestu povrede, što povećava permeabilnost krvnih sudova i prouzrokuje eksudaciju i razvoj intersticijalnog edema. Intersticijalni edem potpomaže ishemiju, što će se odraziti povećanom produkcijom reaktivnih vrsta kiseonika i azotnih oblika, odnosno razvojem oksidativnog i azotnog stresa. Oštećenje tkiva dejtvom oksidativnog stresa, izazvaće povećanu lipidnu peroksidaciju i permeabilnost ćelijskih membrana, što dovodi do ubrzane degradacije ECM i edema (Reed i Rubin, 2010). Akumulacija fragmenata glikozaminoglikana ECM-a smatra se jednim od značajnih mehanizama u formiranju edema, pre svega zbog svojih hidrofilnih svojstava (Reed i Rubin, 2010). Progresija intersticijalnog edema smanjuje cirkulaciju krvi kroz kapilare, što deluje stimulatивно na povećanje limfne cirkulacije. Ovoj intersticijalni protok je jako bitan i za limfagenezu (Ongstad i sar., 2010). Kretanje tečnosti u intersticijumu koje je povezano sa formiranjem edema, iako može imati jako spor, čak neprimetan tok, bitno utiče na morfogenezu tkiva, ćelijsku migraciju i diferencijaciju, kao i remodelovanje matriksa u toku zarastanja.

Znatno uvećan protok krvi u intersticijumu može delovati kao okidač na fibroblaste u smeru remodelacije ECM i favorizovanja formiranja fibroznog tkiva (Wiig, 2011). Ne treba zanemariti ni ulogu mastocita, koji pored produkcije vazoaktivnih supstanci, poput histamina i serotoninina, oslobađaju i proteolitičke enzime, koji doprinose formiranju intersticijalnog edema (Wiig, 2011). Kontrola i ograničavanje edema je od velikog značaja za regeneraciju tkiva, obzirom da se oštećeno tkivo ne može potpuno regenerisati pre kompletne eliminacije otoka.

Oštećeno tkivo prolazi uvek kroz fazu ishemije, a zatim reperfuzije. Ekstremna hronična hipoksija vodi u trajno oštećenje i gubitak tkiva. Nasuprot tome, umerena ili blaga kratkotrajna hipoksija, vodi sigurnoj regeneraciji tkiva.

Ćelijski odgovor na nastalu hipoksiju rezultira oslobađanjem hipoksija inducibilnog zavisnog faktora i hipoksija inducibilnog nezavisnog faktora (engl. *hypoxia inducible factor* - HIF), na osnovu kojih će se raziti dva mehanizma



(Medzhitov, 2010). Medijatori oba mehanizma, HIF zavisnog i HIF nezavisnog, omogućavaju preživljavanje ćelija aktiviranjem transkripcije gena koji su uključeni u brojne fiziološke aspekte ćelija (energetski metabolizam, rast, migraciju, invaziju i angiogenezu) (Elvidge i sar., 2006).

Oštećeno tkivo uvek prvo prolazi kroz fazu metaboličke hipoksije, gde i pored dovoljne koncentracije kiseonika, ćelije nisu u stanju da ovaj kiseonik iskoriste za proces respiracije. Aktivacijom HIF-nezavisnog mehanizma, omogućava se preživljavanje ćelija u uslovima izuzetno niskih koncentracija kiseonika, ali i formiranje novog tkiva, što je za proces zarastanja neophodno. Nasuprot tome, daljom evolucijom posttraumatskog procesa i aktivacijom HIF-zavisnog mehanizma u uslovima blage ili umerene hipoksije stimuliše se vaskularizacija i omogućava preživljavanje ćelija (Luo i sar., 2009).

#### 2.1.2.2. Imuna faza inflamacije (leukocitarna, intermedijarna)

Nakon faze ishemije i reperfuzije nastupa infiltracija oštećenog tkiva inflamatornim ćelijama i bakterijama. Ova faza praćena je aktiviranjem i migracijom brojnih ćelija u intersticijum, kako parenhimalnih (epitelnih), tako i fibroblasta, makrofaga, mastocita, limfocita, endotelijalnih i ćelija krvi. Infiltracija intersticijuma se događa u momentu slabe oksigenacije tkiva, tako da bi jedna od uloga ovog procesa mogla biti ishrana oštećenog tkiva (Aller i sar., 2007).

Prve inflamatorne ćelije koje dolaze na mesto oštećenja su neutrofili, a nakon njih mastociti i makrofagi koji su nastali iz cirkulišućih monocita. Odmah po ekstravazaciji neutrofili, bivaju "zarobljeni" u fibrinskom ugrušku, ali kroz samo nekoliko sati transmigriraju kroz zid venula u intersticijum. Rekrutovani i aktivirani neutrofili u intersticijumu započinju proces uklanjanja devitaliziranog tkiva (debridman) i neutralizaciju infektivnih agenasa. Tokom ovih procesa, oslobađaju se mnoge antimikrobne supstance (ROS, katjonski peptidi, leukotrieni, prostaglandini) i proteaze (elastaze, katepsin G-proteinaze, urokinaze). Njihovo oslobađanje je upravo jedan od razloga prolongiranja zarastanja, jer deluju toksično na ostale prisutne ćelije (Medzhitov, 2010).

Klinički se ova faza može manifestovati i pojavom mlečnog, žućkastog ili zelenkastog sekreta, tj. gnoja, kao sigurnog znaka infekcije rane. Gotovo svi sojevi *Staphylococcus aureus*-a imaju sposobnost produkcije velikog broja štetnih enzima (nukleaza, proteaza, lipaza, hijaluronidaza i kolagenaza), koji mogu dovesti do odlaganja zarastanja i razvoja infekcije unutar rane (Edwards i Harding, 2004). Razvoj infekcije je uvek povezan sa inflamatornom fazom zarastanja.

Treba spomenuti i ulogu tzv. pentraksina u akutnoj inflamatornoj fazi. Najzanimljiviji među njima je C-reaktivni protein (CRP), koji je uvek pratilac zapaljenskih procesa u organizmu. Smatra se da je za produkciju CRP-a od strane hepatocita, odgovoran interleukin 6 (IL-6), kao jedan od medijatora inflamatornog odgovora (Middleton, 2011). Postoji veliki broj pentraksina i njihova uloga u toku inflamacije je uglavnom protektivna, a stimulišu i rezoluciju inflamatorne faze (Middleton, 2011, Eming i sar., 2009).

Monociti neposredno po napuštanju krvnih sudova i migriranja u okolno tkivo, prolaze kroz diferencijaciju u tkivne makrofage. Postoje dve vrste makrofaga. M1 makrofagi (engl. *Classically activated macrophages*), koji ekspresijom inflamatornih citokina (IL-1, -6 i -23, interferon gama (IFN- $\gamma$ )) i ROS učestvuju u fagocitozi i eliminaciji mikroorganizama, čime dovode do aktiviranja tipa I imunog odgovora (Eming i sar., 2009). M2 makrofagi (engl. *Alternatively activated macrophages*) su uključeni u angiogenezu, remodelaciju tkiva i rezoluciju inflamacije, tako da se smatraju stimulatorima reparacije tkiva (Eming i sar., 2009).

T-helper limfociti imaju ključnu ulogu u modulaciji diferencijacije makrofaga. Tip 1 T-limfocita (Th1) produkuje citokine IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , koji dovode do transformacije makrofaga u M1 podtip, dok tip 2 T-limfociti (Th2), sintezom IL-4, -5 i -13, stimulišu M2 makrofage (Eming i sar., 2009). Takođe treba spomenuti i ulogu B limfocita koji sekretuju IL-4 i IL-6 i pojedina antitela, čime učestvuju u razvoju fibroze (Eming i sar., 2009). Osim toga, limfna cirkulacija ima glavnu ulogu, jer migriranjem makrofaga, mastocita i dendritskih ćelija u limfne čvorove, dolazi do aktivacije limfocita.

Brojna istraživanja ukazala su na značaj trombocita u inicijaciji i propagaciji inflamatornog procesa. Ove ćelije su bogate sekretornim granulama (alfa, delta i lambda tip granula) i lizozomima (Wozniak i sar., 2017). Najveće i najzačajnije među njima su alfa-granule, koje sadrže dve vrste proteina. Prvi proteini (membranski) će se naći na površini trombocita, a drugi (rastvorljivi) će biti oslobođeni u ECM. Alfa granule imaju značajnu ulogu i u nastanku inflamacije, kako ekspresijom receptora na površini membrane koje dovode do povećane adhezije trombocita sa ostalim ćelijama krvi (P-selektin), tako i oslobađanjem brojnih hemokina (Blair, 2009). Jedan od značajnih dokaza da trombociti promovišu zarastanje rane je sve češća primena „trombocitnog faktora rasta“ (PDGF, eng. *platelet-derived growth factor*) u terapiji hroničnih rana (Blair, 2009). Treba istaći da alfa granule trombocita pored PDGF, sadrže i druge brojne faktore rasta, od kojih pojedini pospešuju, a pojedini blokiraju angiogenezu: vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), fibroblastni faktor rasta (FGF), epidermalni faktor rasta (EGF), hepatocitni faktor rasta (HGF) i insulinu sličan faktor rasta (IGF) (Blair, 2009).

U ovoj fazi perzistira neadekvatna upotreba kiseonika. Da bi se metabolički prilagodili hipoksičnim uslovima i obavljali svoju funkciju aktivirani fagociti (monociti i granulociti) favorizuju anaerobnu glikolizu kao glavni izvor ATP-a (Eming i sar., 2009). Dokazano je da je za regulaciju enzima tokom ove glikolize, kao i za adekvatno korišćenje proizvedenog ATP-a od strane fagocita u hipoksičnim uslovima od suštinskog značaja HIF-1 $\alpha$  (Eming i sar., 2009; Redd i sar., 2004). HIF-1 u makrofagima doprinosi eliminaciji patogena i primarno je regulisan molekulima iz familije propil hidroksilaza, koji u uslovima hipoksije tkiva bivaju aktivirani i utiču na indukciju specifičnih gena koji koordiniraju povećanje sinteze i akumulacije HIF-1 $\alpha$  (Eming i sar., 2009; Redd i sar., 2004). Treba napomenuti da na povećanje aktivnosti propil hidroksilaza, pored smanjene koncentracije kiseonika, utiču i drugi faktori poput metaboličke homeostaze, koncentracije gvožđa, azotnih oksida, itd.

U toku posttraumatskog inflamatornog odgovora aktivira se i urođeni imuni odgovor. Njegova aktivacija bazirana je na prepoznavanju tzv. pretećih signala (engl. DAMPs - *danger associated molecular patterns*) i patogenih molekularnih signala (engl. PAMPs - *pathogen-associated molecular patterns*) (Gurtner i sar., 2008). Ovi signali, DAMPs i PAMPs, bivaju prepoznati od strane specifičnih receptora (engl.

PRRs – *pattern recognition receptors*), koji mogu biti sekretovani, a mogu se nalaziti i u citoplazmi ili vezani za ćelijsku membranu (Gurtner i sar., 2008). Jednom aktiviran, TLRs (engl. *Toll-like receptors*) indukuje seriju signala, koji dalje vode aktivaciji transkripcionih faktora nuklearnog faktora kappu B (NF-(k)B), AP - 1 i interferon – regulatorog faktora (IRF). Prepoznavanjem DAMPs i PAMPs molekula, odnosno signala, TLRs učestvuju u regulaciji inflamatornog odgovora u toku zarastanja rana, kako u sterilnim, tako i u nesterilnim uslovima (Gurtner i sar., 2008). Rana u toku faze ishemije i reperfuzije, u prisustvu povećanog oksidativnog stresa, dovodi do aktivacije TLR-2 i TLR-4 receptora. Brojna ispitivanja pokazala su da je njihova uloga povezana sa stimulacijom fibrogeneze i zarastanjem rane ožiljnim tkivom pre nego regeneracijom (Gurtner i sar., 2008, Li i sar., 2007).

Jedan od značajnih okidača ove inflamatorne faze je i aktivacija NF-(k)B, koja dovodi do kaskade reakcija čiji je krajnji rezultat ekspresija ciljnih (specifičnih) gena (Akbik i sar., 2014). Ekspresija gena aktivira sintezu citokina i njihovih receptora, hemokina i njihovih receptora, adhezionih molekula i medijatora zapaljenja (histamin, serotonin i dr.) (Li i sar., 2007). Pored toga što aktivise i stimuliše inflamaciju, NF-(k)B je veoma značajan i za rezoluciju zapaljenja i reparaciju tkiva.

#### 2.1.2.3. Endokrina faza inflamacije (kasna, angiogeneza)

U ovoj završnoj fazi inflamatornog procesa, dominira proces angiogeneze, a kako je ona preduslov za distribuciju brojnih supstanci u organizmu, među kojima se nalaze i hormoni, naziva se i “endokrina” faza (Kurz i sar., 2003). Angiogeneza se definiše kao rast novih krvnih sudova iz već postojećih (Kurz i sar., 2003). Iako je krajnji cilj formiranje novog krvog suda, mlade endotelijalne ćelije igraju značajnu antioksidativnu i imunu ulogu u početnoj fazi inflamacije, čime doprinose rezoluciji i progresiji regeneracije (Kurz i sar., 2003, Ribatti i sar., 2007).

Angiogeneza se bazira na endotelijalnoj proliferaciji (izdanak) ili mikrovaskularnom rastu. Angiogeneza koja zavisi od endotelijalne proliferacije prolazi kroz pet faza (Kurz i sar., 2003):

- I - dezintegracija bazalne membrane i formiranje novih izdanaka koji penetriraju u perivaskularnu stromu;
- II - migracija endotelijalnih ćelija duž novonastalog izdanka;
- III - proliferacija endotelijalnih ćelija;
- IV - formiranje kanala, račvanje i formiranje vaskularnih petlji koje vode ravoju vaskularne mreže;
- V - perivaskularna apozicija pericita i glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova, kao i sinteza „*de novo*” komponenata bazalne membrane.

Drugi tip angiogeneze (mikrovaskularni rast) dešava se pod uticajem aktivacije specifičnih endotelijalnih progenitornih ćelija koštane srži. U slučaju blagih ili umerenih povreda tkiva, ovaj mehanizam se dešava pod uticajem sekrecije proangiogeničnih citokina, dok kod teških povreda tkiva praćenih nekrozom, dolazi do transformacije ovih progenitornih ćelija u vaskularne ćelije (Garin i sar., 2005).

Proces angiogeneze regulisan je od strane velikog broja faktora, među kojima su najznačajniji: VEGF, TGF, FGF-2, PDGF, angioprotein, angiostatin i trombospondin-1. Manje konvencionalni endogeni stimulatori angiogeneze su eritropoetin, angiotenzin II, endotelini, andromedulini, adipokini (leptin, adiponektin), neuropeptid-Y i vazoaktivni intestinalni peptid (Bochaton-Piallat i sar., 2016)

Angiogeneza je usko povezana sa procesom formiranja mladog granulacionog tkiva, jer je neophodno obezbediti ishranu ćelija u novonastalom tkivu (Ridiandries i sar., 2017). Granulaciona faza počinje nakon tri do četiri dana po nastanku povrede tkiva, pod uticajem makrofaga, fibroblasta, keratinocita i endotelijalnih ćelija. Uporedo sa formiranjem granulacionog tkiva, vaskularne ćelije reaguju sa provizornim matriksom sastavljenim od fibrina, fibronektina i vibronektina i dolazi do zamene fibrinskog matriksa granulacionim tkivom, u koje vrlo brzo migriraju keratinociti. Rezolucija inflamatorne faze je vođena uglavnom lokalno aktivisanim medijatorima, sintetisanih iz esencijalnih masnih kiselina, tzv. eikosanoididima, dokoanoididima,

resolvinima i lipoksinima. Medijatori svoje antiinflamatorne efekte ostvaraju inhibicijom produkcije ROS-a, smanjenjem propustljivosti krvnih sudova, blokiranjem adhezije molekula za leukocite i endotelijalne ćelije, smanjenjem sinteze hemokina i prevencijom adhezije i transmigracije neutrofila kroz endotel krvnih sudova (Ridiandries i sar., 2017).

Progresija rezolucije inflamacije stimuliše fazu epitelizacije. Ovaj proces počinje jedan do dva dana nakon nastanka povrede, migracijom keratinocita prema ivicama rane. Migracija i organizacija keratinocita je složen proces vođen interakcijom brojnih medijatora poput faktora rasta (EGF, TGF- $\alpha$ , PDGF), integrina, metaloproteinaza (MMP-1, -9 i -10), plazminogena i strukturnih proteina. Svi ovi molekuli utiču na organizaciju provizornog matriksa i degradaciju kolagena. Pri završetku ove faze dolazi do promene mezenhimalnog fenotipa keratinocita u epitelijalni fenotip (Martinotti i Ranzato, 2013).

Fibroblasti takođe igraju značajnu ulogu u rezoluciji inflamacije. Pored produkcije ECM, oni mogu uticati i na proces angiogeneze sekrecijom faktora rasta. Pojedini faktori rasta, naročito PDGF i TGF- $\beta$  iniciraju diferencijaciju fibroblasta u miofibroblaste i time doprinose kontrakciji rane (Tracy i sar., 2016; Robinson i sar., 2012). Istoimeni faktori rasta učestvuju u daljoj remodelaciji tkiva, koja je uglavnom praćena organizacijom ECM, odnosno iščezavanjem granulacionog tkiva, revaskularizacijom, sintezom kolagena i elastina, kao i produkcijom proteoglikana i glikoproteina (osnovnih molekula ECM). Uporedo sa ovim procesima dolazi i do zamene kolagena tip III u kolagen tip I, rezultirajući stvaranjem većih kolagenih fibrila uređenih u paralelne snopove (Tracy i sar., 2016; Robinson i sar., 2012). Tokom ove faze, većina makrofaga, endotelijalnih ćelija i miofibroblasta prolazi kroz apoptozu, ostavljajući za sobom tkivo sastavljeno uglavom od kolagenih vlakana i proteina ECM-a. Remodelujuća faza počinje 2-3 nedelje nakon nastanka povrede i može trajati i do godinu dana, a u nekim slučajevima i duže, sve u zavisnosti od intenziteta povrede i vrste tkiva (Tracy i sar., 2016; Robinson i sar., 2012; Eming i sar., 2009).

### 2.1.3. Proliferacija

Proliferativna faza se odvija između 4. i 21. dana i kako se u početku preklapa sa inflamatornom fazom, tanka je granica koja može precizno odvojiti ove dve faze.

Ovu fazu karakteriše proliferacija fibroblasta i keratinocita koji će dalje stimulisati angiogenezu, formiranje ECM i epitelizaciju (Reinke i Sorg, 2012). U toku ove faze inflamatorne ćelije produkuju faktore rasta poput epidermalnog faktora rasta (EGF), PDGF, keratinocitnog faktora rasta (KGF) i FGF koji stimulišu proliferaciju i migraciju keratinocita i fibroblasta (Borena i sar., 2015). Migrirali fibroblasti pod dejstvom PDGF sintetišu kolagen i glavne komponente ekstracelularnog matriksa, poput glikozaminoglikana i proteoglikana. Maksimum depozicije kolagenih vlakana u rani je oko 21. dana (Childs i Murthy, 2017).

Pored sinteze kolagena, i elemenata ECM, fibroblasti se pod uticajem PDGF-a transformišu u miofibroblaste- ćelije odgovorne za kontrakciju rane. Za formiranje mladih krvnih sudova odgovorne su endotelne ćelije, koje stimulisane VEGF i FGF započinju proces angiogeneze. Fibroblasti popunjavaju dno rane i zajedno sa proliferišućim kapilarima formiraju granulaciono tkivo. Uporedo sa ovim procesima, KGF stimuliše keratinocite na produkciju epitelnih ćelija (Thorne i sar., 2013).

Aktivirani keratinociti menjaju svoju strukturu tako što im se smanjuje sadržaj keratina 1 i 10 tipičnih za diferencirane keratinocite, dok se povećava proizvodnja keratina 6, 16 i 17, koji predstavljaju rane markere epitelizacije rane za koje se pretpostavlja da povećavaju elasticitet ćelija neophodan za uspešnu migraciju (Freedberg i sar., 2001). Promene u strukturi integrina i proizvodnja matriks metaloproteinaza, omogućuju ćelijama migraciju kroz novonastali ECM. Epitelizacija je jedan od značajnih faktora zarastanja rana i često se koristi kao parametar za definisanje uspešnosti ovog procesa (Vukelić i sar., 2011).

#### **2.1.4. Maturacija**

Prateći bogatu proliferaciju i sintezu ECM, proces zarastanja ulazi u finalnu, remodelujuću fazu. Remodelujuća faza počinje 2-3 nedelje posle nastanka povrede i može trajati nekoliko meseci, godinu dana, pa čak i duže u zavisnosti od intenziteta povrede i vrste tkiva (Tracy i sar., 2016)

Uspesna reepitelizacija ponaša se kao okidač sinteze fibrina, fibronektina, kolagena III i ostalih elemenata provizornog matriksa od strane fibroblasta, miofibroblasta i keratinocita. Fibroblasti su ključne ćelije maturacione faze, odgovorne za transformaciju kolagena tip III u kolagen tipa I (Romo i sar., 2016). Ovaj proces konverzije kolagenih vlakana traje u proseku 30 dana, dok se maksimum u njihovoj čvrstini i otpornosti očekuje između 42. i 60. dana (Childs i Murthy, 2017). Karakteristika ove faze je i remodelacija ECM, kako bi svojom građom i sastavom odgovarao tkivu (Tracy i sar., 2016). Proces remodelacije ECM podrazumeva zamenu provizornog matriksa zrelim matriksom, koji karakteriše veći sadržaj kolagenih vlakana tipa I i molekula poput glatko mišićnog aktina i miozina u ćelijama (Tomasek i sar., 2003).

Tkivo rane prolazi i kroz fiziološku kontrakciju, koja se mestimično prožima tokom celog procesa zarastanja, a za koju su odgovorni miofibrili (kontraktilni fibroblasti) koji se nalaze u povređenom tkivu (Tracy i sar., 2016). U završnoj fazi uspešne reparacije tkiva događa se apoptoza ćelija poput miofibroblasta (Darby i sar., 2016), deaktivacija i diferencijacija keratinocita (Cheng i sar., 2013). Maturacionu fazu karakteriše i regresija većine novonastalih kapilara, tako da se gustina krvih sudova unutar tkiva polako vraća na nivo koji je bio pre povrede.

#### **2.1.5. Koštana regeneracija**

Pojedine rane u organizmu, poput rana nastalih, ekstrakcijom zuba, pored opisanih faza prolaze i kroz proces koštane regeneracije. Koštana regeneracija je složen mehanizam koji zahteva angažovanje raličitih tipova ćelija i bioloških agenasa koji stimulišu ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju i organizaciju tkiva (Ferreira i sar., 2013). Među ovim ćelijama najvažnije su mezenhimalne matične ćelije, koje se pod



dejstvom faktora rasta diferentuju u osteoblaste. Ovako diferentovani osteoblasti poseduju osteoinduktivna i ostekonduktivna svojstva, čime su odgovorni za migraciju koštanih ćelija (El-Amin i sar., 2010).

Još u toku proliferacije i remodelacije tkiva, oko sedmog dana, započinje proces mineralizacije provizornog matriksa. U ovom momentu, alveolarna čašica je delimično prekrivena tankim slojem epitelnih ćelija i ispunjena dobro organizovanim provizornim matriksom (PM) sastavljenim, između ostalog, od kolagena tipa III, fibrina, fibronektina i ostalih elemenata ECM. Fibronektin vezuje pojedine faktore rasta i time se smatra ključnim za transformaciju fibroblasta u osteoblaste. Uloga osteoblasta se ogleda u sintezi osteoidnog matriksa. Proces mineralizacije PM kreće od periferije ka centru defekta, odnosno u slučaju ekstrakcionih rana od apikalne trećine i ivice alveolarnog grebena. Oko sedmog dana se već mogu uočiti primarne koštane trabekule, odnosno nezrelo i bogato vaskularizovano koštano tkivo (Ferreira i sar, 2013). Nezrele koštane trabekule pružaju se celom dužinom defekta prateći novonastale krvne sudove, koji su neophodni za dalju mineralizaciju i depoziciju kosti. Paralelno sa ovim procesom unutar defekta, pojedini osteoklasti na periferiji alveolarne kosti dovode do progresivne resorpcije (Farina i Trombelli., 2012).

Na pojedinim mestima ova resorpcija alveolarne kosti dovodi do uspostavljanja komunikacije između koštene srži interdentalnog septuma i novoformiranog nezrelog koštanog tkiva unutar rane.

Uporedo sa ovim procesom, dolazi do gotovo potpune zamene PM mladim koštanim tkivom. Osteoklasti prisutni na površini alveolarne kosti, oko 14 dana započinju i resorpciju trabekula novoformirane kosti, što je ujedno i početak njenog remodeliranja i sazrevanja (Farina i Trombelli., 2012). Mladi krvni sudovi polako se gube i formiraju se zrele koštane gredice, odnosno zamenjuje se nezrelo (primarno) u zrelo (sekundarno, lamelarno) koštano tkivo. Već oko 21. dana, broj krvnih sudova je drastično manji, a većina defekta ispunjena je koštanim trabekulama (Mendes i sar., 2010).

Proces mineralizacije koštanog tkiva započinje oko četvrte nedelje. Ogleda se u konsolidaciji koštanog tkiva i formiranju koštanih gredica pravilnog rasporeda, kao i

diferencijaciji osteoblasta u osteocite. Ova faza sazrevanja i remodelacije koštanog tkiva može trajati jako dugo, ali se u većini slučajeva završi nakon godinu dana.

## **2.2. Uloga molekula ekstracelularnog matriksa u procesu zarastanja**

Ekstracelularni matriks je kompleksna struktura koja se sastoji od komponenata sintetisanih i deponovanih van ćelije, obezbeđujući strukturni i funkcionalni integritet tkiva i organa. Uloga ECM u procesu zarastanja je višestruka. Pored toga što služi kao prostor u kome se odigravaju brojni procesi, njegove komponente, poput proteina, dolaze u interakciju sa prisutnim ćelijama, i utiču na dinamiku gotovo svih faza u procesu zarastanja (Tracy i sar. 2016). U inflamatornoj fazi, ECM je sredina u kojoj migriraju ćelije iz krvnih sudova, u toku epitelizacije signalni molekuli poreklom iz ECM-a stimulišu i usmeravaju migraciju keratinocita na površinu rane, dok su proteini ECM-a ključni za formiranje granulacionog tkiva. Postoji više familija proteina ECM-a, a svaki član familije proteina nalazi se pod kontrolom različitog gena. Ekspresija i funkcija svakog od ovih proteina i njihovih receptora je vremenski i prostorno strogo regulisana tokom zarastanja. Svaki poremećaj u ekspresiji i reakciji ovih proteina sa specifičnim receptorima, rezultiraće kompromitovanjem procesa regeneracije. Stoga je i neophodno razumevanje funkcije i regulatornih mehanizama makromolekula ECM-a unutar tkiva (Tracy i sar. 2016).

## **2.3. Zarastanje ekstrakcionih rana**

Ekstrakcija zuba dovodi do niza reparativnih procesa na tvrdim (alveolarna kost) i mekim tkivima (gingiva, periodontalni ligament). U histološkom smislu, proces zarastanja ekstrakcionih rana prolazi kroz iste faze kao i zarastanje bilo koje druge rane u organizmu. Specifičnosti ovih rana odnose se na njihovu lokalizaciju (razlika u koštanoj strukturi gornje i donje vilice), prisustvo mikroorganizama usne duplje, prisustvo pljuvačke, mehaničko opterećenje rane u toku ishrane, itd. Ove okolnosti mogu značajno uticati na tok i brzinu zarastanja, kao i na pojavu komplikacija nakon ekstrakcije zuba (Farina i Trombelli, 2012; Kujath i Michelsen, 2008). Brojni su faktori koji mogu uticati na fiziološki proces zarastanja ekstrakcione rane. U zavisnosti od

mesta i načina delovanja možemo ih generalno podeliti na opše i lokalne (Farina i Trombelli, 2012; Kujath i Michelsen, 2008).

### ***2.3.1. Opšti (sistemski) faktori***

Ovi faktori podrazumevaju stanje i zdravlje organizma u celini, kao i prisustvo eventualnih sistemskih bolesti koje mogu uticati na sposobnost organizma za ozdravljenjem. Do sada je dokazan uticaj godina, hormonskog statusa, stresa, dijabetesa, pojedinih lekova (kortikosteroidi, lekovi za hemoterapiju), gojaznosti, alkohola, pušenja i kvaliteta ishrane na proces zarastanja i obnove tkiva u organizmu. Oralna (sistemska) primena brojnih antioksidanasa, dala je pozitivne efekte kod većine ovih faktora (Farina i Trombelli, 2012; Kujath i Michelsen, 2008).

Pojedina sistemska stanja, poput starosti i dijabetesa, mogu dovesti do smanjenja vaskularnog protoka i time prouzrokovati lokalnu hipoksiju tkiva, koja će se negativno odraziti na tok zarastanja rane. Oslobođanje štetnih materija u ovim uslovima, naročito slobodnih radikala, odraziće se negativno na tkivo, zbog čega je primena antioksidanasa u terapiji od velikog značaja kod ovih pacijenata (Akbik i sar., 2014; Fakhrabadi i sar., 2014).

### ***2.3.2. Lokalni faktori***

Lokalni faktori su oni koji direktno utiču na proces zarastanja, kao i na karakteristike same rane. Od lokalnih faktora bitno je napomenuti oblik, veličinu rane, kao i njen položaj, ali je od presudnog značaja prisutvo infekcije i oksigenacija, tj. vaskularizacija tkiva. Mnogi od ovih faktora su i međusobno povezani, tako da sistemski poremećaji u organizmu samo potpomažu dejstvo lokalnih faktora i na taj način utiču na zarastanje (Farina i Trombelli, 2012; Kujath i Michelsen, 2008).

Posle ekstrakcije zuba uvek dolazi do resorpcije alveolarne kosti (Hupp, 2008). Poznato je da se 40-60% ukupne resorpcije alveolarne čašice događa u prve tri godine nakon ekstrakcije zuba (Grunder i sar., 1999). Zbog specifičnosti u anatomskej građi donje vilice (slabija vaskularizacija kompaktne mandibule u odnosu na spongioznu

maksilu) ova resopcija je četiri puta brža u mandibuli u odnosu na maksilu (Tallgren, 2003).

### 2.3.2.1. Infekcija

Pojedini autori lokalnu infekciju dele na četiri procesa: kontaminaciju, kolonizaciju, lokalnu infekciju bez oštećenjenja tkiva i invazivnu infekciju sa oštećenjem tkiva domaćina (Edwards i Harding, 2004). U odsustvu eliminacije migriranih mikroorganizama i njihovih endotoksina, dolazi do prolongiranog dejstva proinflammatoryh citokina (IL-1, TNF- $\alpha$ ), povećanja nivoa matriks metaloproteaza koje razgrađuju ECM, rapidne degradacije faktora rasta i posledičnog prolongiranja inflamacije sa razvojem infekcije i hroničnog toka zarastanja (Menke i sar. 2007). Bakterije u inficiranoj rani se nalaze u formi biofilma, sastavljenog od bakterijskog agregata u kome su one međusobno splejane pomoću ekstracelularnog polisaharidnog matriksa koje same sekretuju. Upravo sazrevanje ovog biofilma dovodi do razvoja mikrosredine koja je otporna na antibiotike i blokira dejstvo polimorfonuklearnih leukocita, što je od velikog značaja za razvoj rezistencije na konvencionalnu antibiotsku terapiju. Posebnu tendenciju ka razvoju ovog zaštitnog biofilma poseduju *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i  $\beta$ -hemolitički streptokok (Davis i sar., 2008).

### 2.3.2.2. Oksigenacija tkiva

Oksigenacija tkiva je od velikog značaja za ćelijski metabolizam, posebno produkciju ATP-a, koji je neophodan za normalno odvijanje svih faza u toku zarastanja. Normalna vaskularizacija i oksigenacija su neophodne i za prevenciju infekcije, stimulaciju angiogeneze, diferencijaciju keratinocita, stimulaciju proliferacije fibroblasta, sintezu kolagena, epitelizaciju i kontrakciju rane (Bishop i sar., 2008).

## 2.4. Komplikacije ekstrakcionih rana

Dejstvo opštih i lokalnih faktora, greške terapeuta tokom intervencije (neadekvatna hirurška tehnika, grub i nestručan rad sa oštećenjem okolnih struktura (masivna koštana razaranja i sl.), kao i neadekvatna postoperativna obrada rane i terapija, utiču na razvoj brojnih komplikacija nakon ekstrakcije zuba. Kako je ekstrakcija zuba izuzetno česta procedura, od velikog je značaja redukovanje potencijalnih komplikacija i ubrzanje procesa regeneracije. Komplikacije posle ekstrakcije zuba koje se najčešće javljaju su:

**I - Hematom** - nastaje povredom krvnih sudova u toku intervencije i izlivom krvi u ekstravaskularni prostor. Veličina hematoma zavisi od vrste i veličine povređenog krvnog suda i gustine tkiva koja ga okružuje. Tako manje povrede vena nastale vrhom igle u toku anesteziranja, ne moraju dovesti do razvoja hematoma, dok povrede arterija skoro uvek rezultiraju hematomom zbog većeg protoka krvi i krvog pritiska u ovoj vrsti krvnog suda (Gupta i sar. 2015).

**II - Alveolitis** - karakteriše se jakim bolom koji se javlja 2-3 dana posle intervencije. Ekstrakciona rana je suva (alveolitis sicca), bez gnojnog eksudata ili je ispunjena raspadnutim koagulumom (alveolitis exudativa). Češće se javlja u donjoj vilici i prolongira proces zarastanja rane. Nepoznate je etiologije, ali se smatra da loša prokrvljenost, hipoksija, teška ekstrakcija, alergija, *Treponema denticola*, fibrinoliza i periapikalni procesi doprinose razvoju ove komplikacije. Nedovoljno poznavanje etiologije otežava prevenciju i adekvatnu terapiju alveolitisa (Kolokytsas i sar. 2010).

**III - Ekstrakcioni edem** - javlja se kao posledica nagomilavanja tečnosti u ekstracelularnom prostoru i proporcionalan je dužini trajanja hirurške procedure, traume i elasticitetu okolnog tkiva. Najizraženiji edem javlja se uglavnom jedan dan posle intervencije i češći je u donjoj vilici (Sortino i Cicciu, 2011).

**IV - Infekcija rane** - izazvivaju je najčešće mikroorganizmi usne duplje. Može nastati kolonizacijom mikroorganizama u toku intervencije primenom nesterilnih instrumenata ili sekundarno, kao posledica prolongiranog zarastanja (Edwards i Harding, 2004).

V – *Trismus* - javlja se najčešće posle ekstrakcije zuba u donjoj vilici. Treba napomenuti da trismus može nastati i pod dejtvom faktora koji nisu nužno povezani sa ekstrakcijom zuba kao što su traume, oboljenja temporomandibularnog zgloba, tumori, radio- i hemoterapija, infekcije, urođene anomalije itd. (Marien, 1997; Dhanrajani i Onaidel, 2002).

Od ostalih komplikacija mogu se navesti i dehiscencija rane, fibrozno zarastanje, formiranje granulacija i stvaranje hipertrofičnog ožiljka (keloida).

Poslednjih godina došlo je do značajnog pomaka u prevazilaženju dosadašnjih nedostataka u primeni supstanci koje dokazano stimulatивно utiču na proces zarastanja. Obećavajuće rezultate dala je inkorporacija faktora rasta u nanoliposome i njihova lokalna primena (Kocić i sar., 2017; Mitić i sar., 2017; Todorović i sar., 2017; de Abreu i sar., 2013), ali je mali broj istraživanja bio usmeren na ovakvu primenu antioksidanasa posle ekstrakcije zuba.

## 2.5. Dosadašnje terapijske metode

Dobro poznavanje mehanizma zarastanja rana, kao i faktora koji utiču na njih predstavljaju osnovu kvalitetnog postekstrakcionog tretmana oštećenih tkiva i otklanjanja neželjenih manifestacija. Problem otežanog zarastanja ekstrakcionih rana rešava se prvenstveno uklanjanjem lokalnih uzročnika, revizijom rane i eventualnom sanacijom sistemskog poremećaja. Brže zarastanje rana svakako dovodi do eliminacije bola, otoka ili infekcije, samim tim i poboljšanja kvaliteta života pacijenta (Gupta i sar. 2015; Edwards i Harding, 2004).

Veliki broj studija bavio se proučavanjem zarastanja postekstrakcionih rana. Eksperimentalni model pacova daje odličnu osnovu za proučavanje ovog procesa i rezultati dobijeni na ovaj način omogućuju uvid u zbivanja koja su slična kao ona u ljudskom organizmu (Robinson i sar., 2012). Stvorene rane nakon ekstrakcije zuba kod pacova, slične su ekstrakcionim ranama kod ljudi.

U dosadašnjim istraživanjama korišćen je veliki broj supstanci i metoda sa potencijalnim stimulativnim dejstvom na proces zarastanja. Najčešće proučavani među njima za tretman postekstrakcionih rana jesu brojni biomaterijali, antioksidansi (vitamin C, hijaluronska kiselina, koenzim Q<sub>10</sub>, kurkumin), faktori rasta (PDGF, VEGF, IGF, TFG-β) (Robinson i sar., 2012), kao i primena lasera male snage, polarizovane svetlosti, elektromagnetskih polja i ultrazvuka male snage.

Laseri male snage (LMS) utiču na sintezu kolagena, aktivaciju limfnog sistema, angiogenezu, kao i na proliferaciju epitelnih, vezivnotkivnih i koštanih ćelija (Kawasaki i Shimizu, 2000). Nasuprot laserskoj svetlosti, koja radi na vrlo uskoj talasnoj dužini (monohromatska svetlost), polarizovana svetlost obuhvata veliku talasnu dužinu (polihromatska svetlost) sa takođe malom energijom. Ova vrsta zračenja našla je svoju primenu za lečenje skoro svih komplikacija koje se javljaju nakon ekstrakcije zuba (Kawasaki i Shimizu, 2000).

Primena pojedinih antioksidanasa, poput elaginske kiseline, vitamina C, koenzima Q<sub>10</sub>, kurkumina, takođe je našla svoju primenu u procesu zarastanja rana,

obzirom da je dokazano da stimulativno deluju kako na regeneraciju mekog, tako i na stimulaciju regeneracije koštanog tkiva (Yoneda i sar., 2014; Mohanty i sar., 2012).

Međutim, kao jedan od čestih nedostataka njihove primene je problem održivosti terapijske koncentracije ispitivane supstance na mestu primene, kao i toksični efekat prilikom povećanja koncentracije radi prolongiranog dejstva stimulansa. Pojava nanolipozoma i mogućnost enkapsulacije velikog broja supstanci u iste, dovela je do razvoja novih metoda za lokalnu aplikaciju potencijalnih stimulansa.

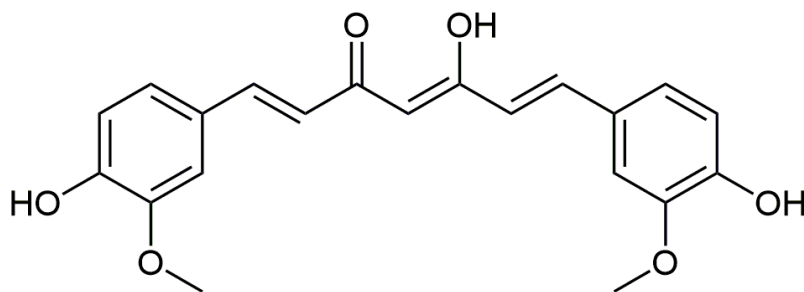


## 2.6. Antioksidansi i nanolipozomi

### 2.6.1. Kurkumin - opšta svojstva i osobine

Kurkuma je biljna vrsta koja pripada porodici đumbira (*Zingiberaceae*) i kroz istoriju, ali i danas se vrlo intenzivno koristi u vidu začina i boje u Kini i Indiji. Aktivne komponentne kurkume su flavonoid kurkumin (diferuloymethane) i razni sastojci eterskih ulja (tumerone, atlantone, zingiberone), dok ostale komponentne čine šećeri, proteini i smole. Najznačajniji aktivni sastojak je kurkumin, koji čini od 0,3 do 5,4 % sirove kurkume (Anamika, 2012).

Kurkumin (KU) je žuti pigment dobijen iz biljne vrste *Curcuma longa* L. koji se već dugi niz godina koristi kao lek u istočnjačkoj medicini, dok poslednjih godina privlači sve više pažnje i u zapadnoj medicini. Kurkumin je polifenol male molekularne mase, koji je prvi put hemijski definisan 1910. godine hemijskom formulom  $C_{21}H_{20}O_6$  (Singh i sar., 2010) (Slika 2). Postoje dve hemijske forme KU, keto i enolna forma, a njegova enolna forma je energetski stabilnija u čvstom stanju i rastvorima.



**Slika 2.** Strukturna formula kurkumina

Različite studije su pokazale da KU poseduje antiinflamatorna, antitumorska, antibakterijska, fungicidna, antivirusna i antioksidativna svojstva (Mitić i sar., 2017; Mourats i sar., 2014; Singh i sar., 2010; Aggarwal i Harikumar, 2009).

Pokazano je da aplikacija KU sprečava nastanak ulkusa, smanjuje ulkus indeks, koji nastaju nakon administracija visokih doza indometacina kod pacova (Morsy i El-Moselhy, 2013). Kurkumin inhibiše rast *Helicobacter pylori*, koja se smatra primarnim

uzročnikom gastričnog ulkusa i kancera (Morsy i El-Moselhy, 2013), što potencijalno pruža mogućnost za njegovu primenu kod osoba sa helikobakteriozom.

Pored toga što nije toksičan za ljude, KU poseduje i sposobnost vezivanja teških metala, poput kadmijuma i olova, redukujući njihovu toksičnost, a ispoljava i svoje protetktivno dejstvo sprečavajući oštećenja moždanih struktura (Mourats i sar., 2014).

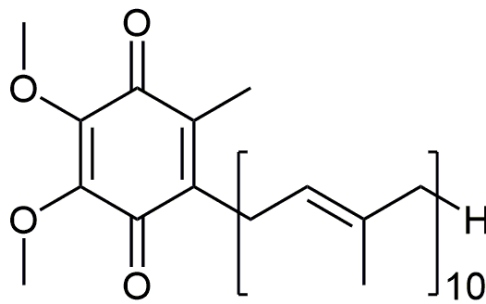
Kurkumin je takođe našao primenu kao sredstvo za zarastanje rana. Pasta koja se pravi od KU i limete koristi se kao tradicionalni lek za terapiju inflamacije (Anamika, 2012), a koristi se i kao sredstvo koje potpomaže zarastanje rana. Takođe aplikacija KU pojačava epitelizaciju i gustinu krvnih sudova (Mitić i sar., 2017). Zahvaljujući antiinflamatornom dejstvu smatra se medijatorom koji može bitno ubrzati i unaprediti proces zarastanja, kako akutnih, tako i hroničnih rana (Mehrbani i sar. 2015). Dokazano je da deluje i kao inhibitor ciklooksigenaze, 5-lipoksigenaze i glutation S-transferaze (Mehrbani i sar. 2015). Antiinflamatorno dejstvo KU ogleda se u:

- I* - smanjenju produkcije i oslobađanja histamina,
- II* - pospešivanju i prolongiranju dejstva antiinflamatornog hormona kortizola,
- III* - pospešivanju cirkulacije krvi, čime se ubrzava i favorizuje detoksikacija.

Kurkumin se upotrebljava kao sredstvo za bojenje hrane, ali i kao aditiv hrani kada nosi oznaku E100. Istraživanja su dokazala da deluje pozitivno na digestiju hrane, naročito masti i na eliminaciju toksina iz jetre (Zingg, 2013). Studije o farmakokinetici KU pokazale su da 40-85% oralne doze ove supstance prolazi nepromenjeno kroz digestivni trakt. Zbog malog stepena apsorpcije, KU se uglavnom priprema sa bromelainom, čime se povećavava apsorbcija i antiinflamatorni efekat.

### 2.6.2. Koenzim Q<sub>10</sub> - opšta svojstva i osobine

Koenzim Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>), poznat i kao ubikvinin, je lipidni molekul široko rasprostranjen u prirodi. U pogledu fizičkih svojstva CoQ<sub>10</sub> je narandžasti lipofilni prah bez mirisa i ukusa. Molekularna masa CoQ<sub>10</sub> iznosi 863,34 g/mol, ima 10 izoprenoidnih jedinica (Slika 3), nije stabilan i raspada se na temperaturi od 46 °C. Koenzim Q<sub>10</sub> postoji u *cis* i *trans* obliku. U prirodi se nalazi samo u *trans* obliku, ali oba oblika se mogu proizvesti biofermentacijom ili hemijskim procesom u laboratoriji (Bentinger i sar., 2010).



**Slika 3.** Strukturna formula koenzima Q<sub>10</sub>

U mitohondrijama se nalazi u oba svoja oblika: redukovanom (ubikvinol) i oksidisanom (ubikvinon). Koenzim Q<sub>10</sub> se nalazi kod ljudi i većine sisara, pojedinih životinja (pacova i miševa), dok se druge forme, koenzim Q<sub>6</sub>, Q<sub>7</sub> i Q<sub>8</sub> nalaze u kvascima i bakterijama. Takođe, CoQ<sub>10</sub> je u ćelijama smešten u sredini fosfolipidnog dvosloja većine membrana ćelijskih organela, kao što su endoplazmatski retikulum, Goldžijev aparat, peroksizomi, lizozomi, vezikule, a kao što je već i napomenuto najveće koncentracije ovog molekula nalaze se u membrani mitohondrija (Bentinger i sar., 2010). U nešto većem procentu nalazi se u ćelijama koje imaju veće enregetske potrebe, poput ćelija srca (kardiomiociti), jetre (hepatociti), skeletnih mišića (miofibrili) i pankreasa (Bentinger i sar., 2010).

Koncentracija CoQ<sub>10</sub> u organizmu zavisi od starosti, pola, rase i zdravlja pojedinca. Koncentracija ovog molekula u plazmi čoveka kreću se od 0,40 do 1,72 μmol/l, kod muškaraca i od 0,43 do 1,47 μmol/l kod žena. Ove koncentracije u zavisnosti

od rase mogu neznatno varirati i iznositi od 0,50 do 1,91  $\mu\text{mol/l}$  (Bentinger i sar., 2010). Veliki broj studija pokazao je da CoQ<sub>10</sub> u velikim dozama preuzimaju sva tkiva, posebno mitohondrije mozga i srca. Deficit CoQ<sub>10</sub> može biti rezultat nedovoljnog unosa kroz hranu, njegove narušene biosinteze, povećane potrošnje u telu ili kombinacijom sva tri faktora (Cordero i sar., 2014).

Najvažnija svojstva CoQ<sub>10</sub> su antioksidativno i bioenergetsko delovanje. Bioenergetska uloga ogleda se kroz produkciju adenzinotriposfata (ATP-a), i za ovu funkciju odgovorna je njegova redoks forma, neophodna za transport protona i elektrona u mitohondrijama. Dokazano je da se promena koncentracije CoQ<sub>10</sub> u mitohondrijama, direktno odražava na energetske bilans ćelije, kao i da mala doza egzogeno unetog CoQ<sub>10</sub> dovodi do značajnih pozitivnih efekata (Bentinger i sar., 2010). Ovakav efekat CoQ<sub>10</sub> na funkcionisanje mitohondrija je zbog njegove značajne uloge kofaktora (koenzima) u kompleksima I-III mitohondrijskog elektron respiratornog lanca (Bentinger i sar., 2010). U svojoj redukovanoj formi CoQ<sub>10</sub> je moćan lipofilni antioksidans koji ima veliki značaj u eliminaciji slobodnih radikala. On dovodi do apsorpcije slobodnih radikala, odnosno do rušenja "lanca antioksidanasa".

Pored svega nabrojanog CoQ<sub>10</sub> štiti DNK od oksidativnog oštećenja koji izazivaju ROS, održava stabilnost ćelijske membrane i učestvuje u regeneraciji drugih antioksidanasa, poput tokoferola i askorbata. Takođe u sadejstvu sa tokoferolom, ubikvinol zadržava peroksidaciju lipida u unutrašnjoj membrani mitohondrija (Cordero i sar., 2014).

Shodno tome, dokazana je njegova zaštitna uloga kod brojnih kardiovaskularnih, neurodegenerativnih oboljenja (Mezawa i sar., 2012), kao i pozitivan efekat na reproduktivni sistem i starenje kože, što je potvrđeno studijama gde CoQ<sub>10</sub>, zajedno sa vitaminom E, vitaminom C i superoksid dismutazom ima značajnu ulogu u zaštitnoj mreži kože (Sale i sar., 2014). Takođe, biopsija gingive kod pacijenta sa oštećenim periodontalnim tkivom pokazala je deficit CoQ<sub>10</sub>, za razliku od zdrave gingive, gde nije uočen deficit ovog molekula. Pojedine studije pokazale su i brže zarastanje i reparaciju mekih tkiva usne duplje prilikom korišćenja suplemenata koji sadrže CoQ<sub>10</sub> (Sale i sar., 2014).

Posebnu pažnju poslednjih godina zauzimaju preparati CoQ10 za topikalnu primenu (Sale i sar., 2014). Međutim, iako postoji veliki broj naučnih studija o medicinskim benefitima CoQ10, ne postoji dovoljno podataka o njegovoj farmakokinetici prilikom topikalne primene. Poznato je da je CoQ10 termolabilni i lipofilni molekul, tako da njegova topikalna biodostupnost nije velika. Iako je medicinski značaj CoQ10 neosporan, neophodan je veći broj studija u pogledu preporučenog dnevnog unosa, koncentracije za topikalnu primenu i biodostupnosti.

### **2.6.3. Nanolipozomi**

Bioaktivni nosioci i dopremanje aktivnih supstanci poput lekova su deo značajanog polja istraživanja u današnjoj medicini. Razvoj novih bioaktivnih materijala postavlja nove zahteve tehnologije u pogledu razvoja dopremanja ovih molekula i svođenja neželjenih efekata na najmanju moguću meru. U tom pogledu, razvijen je veliki broj naprednih nosioca poput lipozoma, hijalurozoma, polimernih micela, nanohidrogelova, polimernih nanovlakana, nanohibridnih gredica, sunđerica i mnogih drugih (Hussain i sar. 2016). Dostava i otpuštanje aktivne supstance u organizmu je u direktnoj vezi sa veličinom čestice. Nano-nosači imaju potencijal da povećaju rastvorljivost, poboljšaju biodostupnost, unaprede vreme oslobađanja i omoguće preciznije ciljanje aktivnih supstanci. Kao posledica enkapsulacije supstance u nanolipozome količina potrebne supstance koja je inkorporirana ili enkapsulirana, je značajno manja, što je od velikog benefita (Khosravi-Darani i Mozafari, 2010; Park, 2007). Lipozomi su mikroskopske sferične vezikule sastavljene iz fosfolipidnog dvosloja nalik membrani, u čijoj sredini se nalazi vodeni medijum. U zavisnosti od pripreme, njihova veličina može varirati od 50 nm do nekoliko stotina nm. Lipidnu komponentu lipozoma čini uglavnom fosfadiholin, izveden iz jaja i sojinog lecitina. Manje komponente u lecitinu su fosfatidilserin, fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamin i fosfatidilinositol. Naelektrisanje površine lipozoma može da bude negativno, neutralno ili negativno u fiziološkom pH opsegu (Park, 2007).

U zavisnosti od broja lamela, veličine i načina pripreme, lipozomi mogu biti podeljenji u sledeće grupe (Khosravi-Darani i Mozafari, 2010):

- mali jedno-lamelarni 20-50 nm (engl. *small unilamellar vesicles*),
- veliki jedno-lamelarni >560 nm (engl. *large unilamellar vesicles*),
- multi-lamelarne vezikule 1700-5000 nm (engl. *multilamellar vesicles*),
- srednji uni-lamelarni >100 nm (engl. *medium unilamellar vesicles*),
- gigantski uni-lamelarni >1  $\mu\text{m}$ ,
- oligo-lamelarni,
- jedno- ili oligo-lamelarni lipozomi dobijeni metodom povratne evaporacije,
- stabilni pluri-lamelarni,
- lipozomi pripremljeni tehnikom istiskivanja (engl. *vesicles extrusion technique*).

Osnovni cilj metodologije u pripremi lipozoma, pored dobijanja odgovarajuće veličine vezikule je formiranje stabilnih membrana odgovarajuće strukture i efikasnost u pogledu skladištenja aktivne supstance bez „curenja” (Mozfari i Mortazavi, 2005).

Zbog svog dvofaznog karaktera, lipozomi mogu biti nosioci lipofilnih i hidrofilnih supstanci. U zavisnosti od vrste supstance koja se prenosi (lipofilna ili hidrofilna), kao i načina pripreme lipozoma, molekuli leka mogu biti različito enkapsulirani unutar lipozoma i pokazivati različite karakteristike u načinu skladištenja i oslobađanja. Lipofilni molekuli se uglavnom nalaze „zarobljeni” u lipidnom dvosloju lipozoma, a kako su slabo rastvorljivi u vodi, problemi poput gubitka aktivnog molekula ili preteranog i preranog oslobađanja su svedeni na minimum tj. gotovo nemogući (Park, 2007).

Hidrofilni lekovi se uglavnom nalaze (skladište) u „vodenom jezgru” lipozoma, mada se u pojedinim situacijama mogu naći i u spoljnom vodenom omotaču. Sastav lipidnog dvosloja, kao i način pripreme lipozoma, direktno utiče na procenat hidrofilne supstance koja se može naći enkapsulirana u lipozom. Lipozomalni sistemi se mogu primeniti za enkapsulaciju i dopremanje širokog spektra bioaktivnih supstanci sa ciljem unapređenja procesa zarastanja rana kao što su: nestredni antiinflamatorni lekovi (Ferreira i sar., 2013), imunoglobulini (Galili i sar., 2010), faktori rasta (Xiang i sar.,

2011), opioidni analgetici (Baxter i sar., 2013), hijaluronska kiselina (Vasquez-Gonzales i sar., 2015), superoksid dismutaza i kurkumin (Manca i sar., 2015). Pored ovih, mogu se prenositi i drugi molekuli poput hormona, faktora krvi, antigena, kozmetike, dijagnostičkih sredstava i gena (Mozafari i Mortazavi, 2005).

**Nanolipozomi** predstavljaju lipidne sfere nanoveličine (prečnik vezikule manji od 20 nm). Oni poseduju ista fizička, strukturna, termodinamička svojstva i mehanizme pripreme kao i lipozomi. Osnovni mehanizam formiranja jednih i drugih je hidrofilno-hidrofobna interakcija između molekula vode i fosfolipida. Međutim, kako bi održali svoju nanometrijsku veličinu tokom skladištenja i pripreme, nanolipozomi moraju imati odgovarajuću stabilnost. U suprotnom, dolazi do njihove agregacije i formiranja mikrometrijskih molekula (Park, 2007).

### 3. CILJEVI RADA

Na osnovu istaknutih činjenica koje se odnose na stimulatívno dejstvo antioksidanasa u slobodnoj formi na proces zarastanja rana, kao i neispitanosti njihovih efekata na istoimeni proces u njihovoj enkapsuliranoj formi u nanolipozome, postavljeni su sledeći ciljevi ove doktorske disertacije:

1. Ispitati efikasnost CoQ<sub>10</sub> i KU na tok i brzinu zarastanja rana nakon ekstrakcije zuba kod eksperimentalnih pacova korišćenjem standardnih metoda ispitivanja mikroskopskih promena i parametara oksidativnog stresa tkiva;
2. Uporediti efikasnost lokalno aplikovanog CoQ<sub>10</sub> i KU, u slobodnoj formi i formi enkapsuliranoj u nanolipozome na tok i brzinu zarastanja ekstrakcionih rana.



## 4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

Istraživanja su izvedena na Institutu za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu, Institutu za patologiju KC Niš i Institutu za biohemiju Medicinskog fakulteta u Nišu.

### 4.1. *In vivo* istraživanje na animalnom modelu pacova

Studija je obuhvatila analizu 108 laboratorijskih pacova Wistar soja, oba pola, telesne mase 250-300 g. Životinje su uzgajane na Institutu za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu. Životinje su čuvane u polikarbonatskim kavezima u kontrolisanim uslovima, na temperaturi  $20 \pm 2$  °C, sa „ad libitum“ dostupnom hranom („VETFARM“ Subotica) i pijaćom vodom. Eksperimentalno istraživanje je odobreno od strane Etičke komisije za rad sa eksperimentalnim životinjama Medicinskog fakulteta u Nišu (broj: 21-160) i odobreno od strane Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije (323-07-00073/2017-05/2 od 06.01.2017).

#### 4.1.1. *Eksperimentalni protokol*

Nakon perioda adaptacije, 108 Wistar pacova bilo je podeljeno u 6 grupa od po 18 životinja kojima su ekstrahirani gornji incizivi (Slika 4). Intervencije su izvedene u periotenalnoj anesteziji sa 10% ketaminom u dozi od 80 mg/kg (Ketamidor 10%, Richter Pharma AG, Wels, Austria), a životinje su žrtvovane aplikacijom prekomerne doze istog anestetika. Nakon ekstrakcije zuba (Slika 5), rana je lokalno premazivana odgovarajućim rastvorima koji odgovaraju određenoj eksperimentalnoj grupi životinja, u trajanju od 21-og dana (Slika 6). Prvo žrtvovanje eksperimentalnih pacova izvršeno je 7., zatim 14. i poslednje 21. dana posle ekstrakcije zuba.



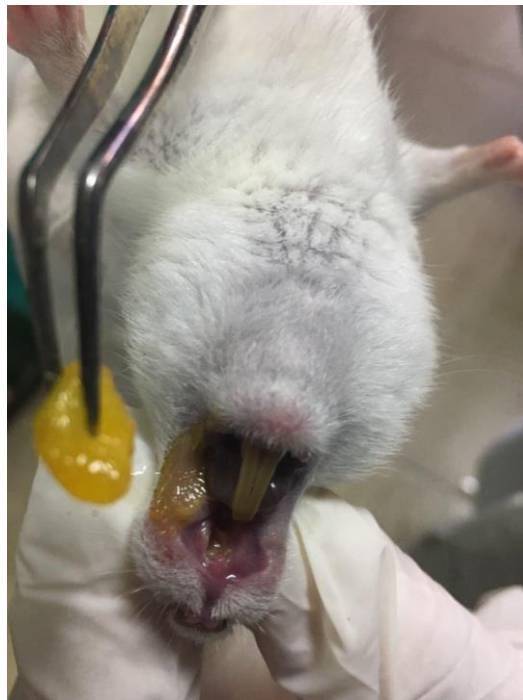
**Slika 4.** Postupak ekstrakcije gornjih inciziva pacova



**Slika 5.** Postekstrakciona rana

Eksperimentalne životinje su podeljene po grupama na sledeći način:

- I. Eksperimentalna grupa, kojoj je nakon ekstrakcije zuba lokalno aplikovan rastvor CoQ<sub>10</sub> (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, USA) u sojinom ulju, u dozi od 6 mg/ml (**Q<sub>10</sub>**).
- II. Eksperimentalna grupa, kojoj je lokalno aplikovan rastvor kurkumina (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, USA) u sojinom ulju u dozi od 4 mg/ml (**KU**).
- III. Eksperimentalna grupa, kojoj je lokalno aplikovan rastvor koenzima Q<sub>10</sub> u sojinom ulju u dozi od 6 mg/ml enkapsuliran u 10% rastvoru nanolipozoma (**NLQ<sub>10</sub>**).
- IV. Eksperimentalna grupa, kojoj je lokalno aplikovan rastvor kurkumina u sojinom ulju u dozi od 4 mg/ml enkapsuliran u 10% rastvoru nanolipozoma (**NLKU**).
- V. Eksperimentalna grupa, kojoj je lokalno aplikovan 10% rastvor čistih nanolipozoma (**NL**).
- VI. Kontrolna grupa, kod koje su rane spontano zarasle (**K**).



**Slika 6.** Lokalna aplikacija antioksidanasa na mesto postekstrakcione rane

#### **4.1.2. Priprema rastvora za lokalnu primenu**

Nanolipozomi (Natterman phospholipids, Germany) u obliku nanosfera pripremani su u destilovanoj vodi kao 10% rastvor. Enkapsulacija rastvora CoQ<sub>10</sub> i KU (koncentracije 6%) u sojinom ulju u 10% nanolipozome, izvršena je u ultrazvučnom kupatilu (Sonorex digital 10p) na 40 °C u trajanju od 30 min.

Efikasnost enkapsulacije određivana je u rastvoru enkapsuliranih nanolipozoma i etanola (3 ml), koji su vorteksirani u trajanju od 3 min i potom centrifugirani (2000 rpm, 5 min) na sobnoj temperaturi. Apsorpcija površnog separisanog sloja merena je spektrofotometrijski na 275 nm korišćenjem V-1800 Shimadzu spektrofotometra. Efikasnost enkapsulacije izračunata je iz formule gde je količina inkorporisanih antioksidanasa podeljena sa početnom količinom antioksidansa i pomnožena sa 100.

## **4.2. Obrada tkiva**

### **4.2.1. Obrada tkiva za patohistološku analizu**

Nakon žrtvovanja skalpelom i hirurškim borerima vršena je disekcija prednjeg maksilarnog segmenta glave (Slika 7) svake eksperimentalne životinje i uzorci su potapani u rastvor 10% puferisanog formalina tokom jednog časa na sobnoj temperaturi. Dekalcinacija je obavljena u 0,1 mol/L rastvoru etilen-diamin-tetraacetatne kiseline (EDTA) tokom 21 dana. Dekalcinisani materijal je zatim ispiran u fosfatnom puferu (PBS). Adekvatni isečci tkiva su obrađivani rutinskim histološkim metodama i ukalupljeni u parafin. Histološki preseći debljine 5 µm dobijeni sečenjem parafinskih kalupa na mikrotomu, deparafinisani su u ksilolu i seriji alkohola opadajuće koncentracije (100%, 95% i 70% etanol), rehidratirani i zatim bojeni:

- standardnim patohistološkim bojenjem hematoksilinom i eozinom (HE),
- histoheмиjski (Trichrom Masson i Van Gieson za kolagen i AB-PAS bojenje za mukopolisaharide).



**Slika 7.** Uzorak maksilarnog segmenta glave pripremljen za fiksaciju

Trihromno bojenje po Massonu izvedeno je u skladu s uputstvom proizvođača. Ono glasi:

1. preliti presek destilovanom vodom,
2. na presek aplikovati 6 kapi Weigertovog gvožđe-hematoksilina i 6 kapi (rastvor A) Weigertovog gvožđe-hematoksilina (rastvor B); ostaviti 10 minuta,
3. bez ispiranja isušiti pločice i na preseke aplikovati 10 kapi alkoholnog rastvora pikrinske kiseline i ostaviti da deluje 4 minuta,
4. brzo isprati u destilovanoj vodi (3 - 4 sekunde) i aplikovati 10 kapi Malorijevog hijalina i ostaviti da deluje 4 minuta,
5. isprati u destilovanoj vodi i na presek aplikovati 10 kapi rastvora fosfomolibdenske kiseline i ostaviti da deluje 10 minuta,
6. bez ispiranja isušiti pločicu i aplikovati 10 kapi Masson anilin plavog i ostaviti da deluje 5 minuta,
7. isprati u destilovanoj vodi i brzo dehidrirati rastućim koncentracijama alkohola i ostaviti 1 minut u poslednjem u nizu apsolutnom etanolu. Očistiti u ksilenu.

Bojenje Van Gieson za kolagen izvedeno je u skladu s uputstvom proizvođača. Ono glasi:

1. prelići presek destilovanom vodom,
2. na presek aplikovati 10 kapi PAS (Periodic acid solution); ostaviti 5 minuta,
3. isprati u destilovanoj vodi,
4. sipati Weigertov rastvor u posudu, zatim staviti pločicu, pokriti kivetu i inkubirati preko noći,
5. isprati u destilovanoj vodi,
6. na presek aplikovati 10 kapi pufera,
7. isprati u destilovanoj vodi,
8. na presek aplikovati 5 kapi Weigertovog gvožđe-hematoksilina (rastvor A) i 5 kapi Weigertovog gvožđe-hematoksilina (rastvor B); ostaviti 10 minuta,
9. isprati u tekućoj vodi iz česme u trajanju od 10 minuta,
10. na presek aplikovati 10 kapi Van Gieson pikrofuksina i ostaviti da deluje 7 minuta,
11. isprati u destilovanoj vodi i brzo dehidrirati rastućim koncentracijama alkohola i ostaviti 1 minut u poslednjem u nizu apsolutnom etanolu. Očistiti u ksilenu.

Dehidracija je obavljena u seriji alkohola rastućih koncentracija i ksilolu, a zatim je izvršeno konačno montiranje slajdova pokrivanjem obojenih slajdova DPX-om i pokrovnim staklima.

Patohistološka analiza obojenih slajdova izvršena je na svetlosnom mikroskopu (Olympus BX43, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) i digitalnim fotografijama dobijenim pomoću imidžing sistema (Olympus cellSens platform standard, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) na uvećanjima x40, x100, x200 i x400. Patohistološka analiza obuhvatila je evaluaciju sledećih parametara: gustina inflamatornog infiltrata, obimnost granulacionog tkiva, stepen angiogeneze i fibroze (Ali-Erdem i sar., 2011; Sultana i sar., 2009; Gorustovich i sar., 2008).

Stepen promena je procenjivan semikvantitativno, formiranjem skora na osnovu stepena izraženosti promena:

- 0 - parametar slabo izražen;
- 1 - parametar umereno izražen;
- 2 - parametar veoma izražen.

Inflamatorni infiltrat je u odnosu na gustinu celularnosti, prisustvo polimorfonuklearnih leukocita i rasprostranjenost, tj. površinu koju zahvata u perialveolarnom mekom tkivu postekstrakcione rane mogao dobiti ocenu:

- 0 - prisustvo malog broja zapaljenskih ćelija,
- 1 - umereno obilan i
- 2 - gust, veoma obilan zapaljenski infiltrat.

Količina granulacionog tkiva procenjivana je u odnosu na procenat rasprostranjenosti, tj. površine koju zahvata, i to na sledeći način: skor 0 - 0-30%; skor 1 - 31-60% i skor 2 - 61-100%. Na velikom mikroskopskom uvećanju (x400, površina polja 0,16 mm<sup>2</sup>) određivan je broj polja koja zauzima granulaciono tkivo, a zatim je određivana frakcija, tj. procenat koji okupira granulaciono tkivo u odnosu na celokupnu površinu analiziranog preseka. Angiogeneza je ocenjena sa:

- 0 - slabo izražena neovaskularizacija,
- 1 - umereno gusti i
- 2 - gusti i mnogobrojni novoformirani krvni sudovi u mekom tkivu oko ekstrakcione rane.

Fibroza je procenjivana u odnosu na izraženost fibroplazije, gustinu fibroblastnih ćelija i fibrocita, kao i u odnosu na količinu i prirodu deponovanih kolagenih vlakana.

- 0 - dominantno prisustvo zrelih, fascikularno organizovanih kolagenih vlakana;
- 1 - umereno obilna količina kolagenih vlakana, grupisanih u slabo kohezivne snopove;
- 2 - prisustvo ranih, nezrelih kolagenih vlakana, uglavnom u retikularnom rasporedu.

#### 4.2.2. Imunohistohemijska analiza

Za imunohistohemijsku analizu ekspresije Osteopontina korišćeno je zečije poliklonalno antitelo na Osteopontin (anti-Osteopontin antibody, ab 6856, Abcam, SAD) i kit za detekciju imunohistohemijske reakcije (Rabbit specific HRP/DAB(ABC) Detection IHC Kit, ab64261, Abcam, SAD).

Histološki preseci debljine 4  $\mu\text{m}$  deparafinisani su i rehidratirani u seriji ksilola i alkohola opadajuće koncentracije (100%, 96% i 75% etanol) i dovedeni do vode. Zatim je izvršena blokada aktivnosti endogene peroksidaze u trajanju od 20 minuta (*Hydrogen peroxidase block*). U cilju regeneracije antigenih epitopa (*antigen retrieval*), preparati su zagrevani u citratnom puferu (pH 6,0) 20 minuta u mikrotalasnoj pećnici. Nakon hlađenja i obilnog ispiranja PBS-om, slajdovi su tretirani proteinskim blokom u trajanju od 10 minuta, kako bi se redukovalo nespecifično vezivanje antitela i pozadinsko prebojavanje. Histološki preseci su zatim inkubirani sa primarnim antitelom (u razblaženju 1:200) u vodenom kupatilu na temperaturi od 23 °C, u trajanju od sat vremena. Nakon obilnog ispiranja PBS-om, nanošeni su po proizvođačkoj specifikaciji reagensi *Biotinylated goat anti-rabbit IgG (H+L)* 10 minuta, a nakon ispiranja i *Streptavidin Peroxidase*, takođe sa inkubacijom u trajanju od 10 minuta.

Vizuelizacija reakcije izvršena je pod kontrolom mikroskopa korišćenjem hromogena DAB (3, 3'-diaminobenzidin) u odgovarajućem supstratu. Prisustvo pozitivne reakcije verifikovano je i kvantifikovano kasnije precipitatom braon boje na mestima interakcije antigen-antitelo (Mori i sar., 2008; Ivanovski i sar., 2000). Nakon obilnog ispiranja u tekućoj vodi, izvršena je imerzija preparata u Majerov hematoksilin, u cilju kontrastiranja bojenja. Dehidratacija je obavljena u seriji alkohola rastućih koncentracija i ksilolu, a zatim je izvršeno konačno montiranje slajdova pokrivanjem obojenih slajdova DPX-om i pokrovnim staklima.

Svaka serija imunohistohemijskog bojenja obuhvatila je i negativne kontrole koje su dobijene izostavljanjem koraka nakapavanja primarnog antitela, već je u tom koraku na pločice nanošena ekvivalentna količina čistog diluenta.



#### **4.2.3. Određivanje nivoa oksidativnog stresa**

Za određivanje nivoa oksidativnog stresa meko tkivo je usitnjavano, a potom uz pomoć homogenizatora (IKA, Works de Brazil Ltda Taquara, RJ 227130-00) pripremani su 10% homogenati u destilovanoj vodi. Homogenati (10% w/v) su centrifugirani na 1500×g, 10 min na 4 °C. Nakon centrifugiranja uzimani su bistri supernatanti iz kojih su određivani sledeći parametri:

- koncentracija malondialdehida (MDA),
- koncentracija uznapredovalih produkata oksidacije proteina (AOPP),
- aktivnost katalaze (CAT).

##### **4.2.3.1. Određivanje koncentracije malondialdehida**

Intenzitet lipidne peroksidacije u tkivu određivan je spektrofotometrijski na osnovu reakcije sa tiobarbiturnom kiselinom (Ohkawa i sar., 1979). Apsorpcija bojene reakcije merena je na 532 nm. Koncentracija MDA izračunata je korišćenjem koeficijenta molekularne ekstinkcije za MDA ( $1,56 \times 10^{-5} \text{ mol cm}^{-1}$ ), a izražavana je po miligramu proteina.

##### **4.2.3.2. Određivanje koncentracije uznapredovalih proteina u homogenatu**

Koncentracija AOPP u tkivu određivana je spektrofotometrijskom metodom po Witko-Sarsat-u (Witko-Sarsat i sar., 1996), koja se bazira na reakciji AOPP-a sa kalijum-jodidom u kiseloj sredini. Intenzitet boje je očitavan na 340 nm. Koncentracija je izražavana u  $\mu\text{mol/mg}$  hloramina T/mg proteina.

##### **4.2.3.3. Određivanje aktivnosti katalaze**

Aktivnost katalaze određivana je spektrofotometrijskom metodom po Goth-u (Goth, 1991), koja se zasniva na sposobnosti katalaze da razlaže vodonikperoksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) kao supstrat, pri čemu se enzimska reakcija zaustavlja dodavanjem amonijum molibdata, a nastali žuti kompleks preostalog  $\text{H}_2\text{O}_2$  i molibdata se meri na 405 nm u odnosu na slepu probu. Aktivnost enzima izražena je u katalitičkim jedinicama po gram proteina (kU/g proteina).

#### **4.2.3.4. Određivanje količine proteina**

Količina ukupnih proteina u tkivima, određena je metodom po Lowry-u (Lowry i sar., 1951), koristeći goveđi serum albumin kao standard.

#### **4.3. Statistička obrada podataka**

Dobijeni rezultati, izraženi kao srednje vrednosti i standardne devijacije, prikazani su tabelarno i grafički metodama deskriptivne statistike. Poređenje parametrijskih obeležja vršeno je jednosmernom analizom varijanse (ANOVA) i post hoc Tuckey-evim testom. Statistička obrada vršena je u softverskom paketu SPSS (Verzija 21; IBM Corp, 2012) na nivou statističke signifikantnosti  $p < 0,05$ .

## 5. REZULTATI

### 5.1. Patohistološka analiza

Zarastanje ekstrakcione rane odvija se kroz četiri stadijuma koji se sukcesivno nadovezuju jedan na drugi. Njihovo hronološko definisanje je veoma teško, jer im se mikromorfološke slike međusobno prepliću. Etape u zarastanju rane su inflamatorna faza, proliferativna faza i faza maturacije. Patohistološkom analizom procesa zarastanja mekih tkiva posle ekstrakcije zuba u svim ispitivanim grupama zabeležene su klasične faze tkivne reparacije, sa adekvatnom hronološkom distribucijom i uočljivom razlikom između ispitivanih grupa.

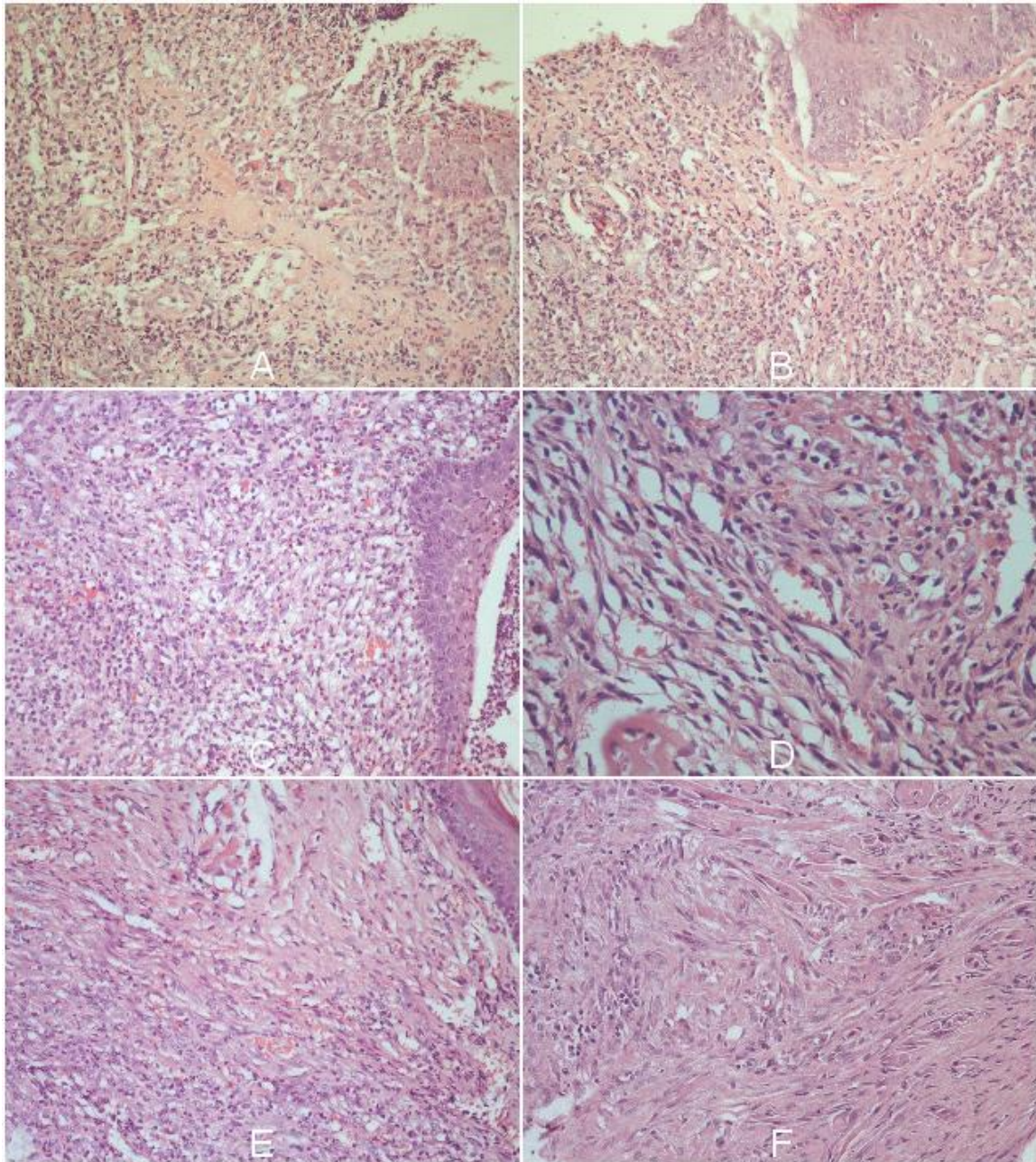
#### *5.1.1. Patohistoška i imunohistohemijska analiza isečaka mekog tkiva rane sedam dana posle ekstrakcije zuba*

Na histološkim presecima dobijenih žrtvovanjem eksperimentalnih životinja na kraju prve nedelje posle ekstrakcije maksilarnih inciziva, patohistološkom analizom utvrđeno je prisustvo mikromorfoloških karakteristika inflamatorne faze reparacije, koja se karakteriše razvojem zapaljenske reakcije i odstranjivanjem debrisa, i inicijalne proliferativne faze sa razvojem granulacionog tkiva (Slika 8, Tabela 1-2, Grafikon 1-2).

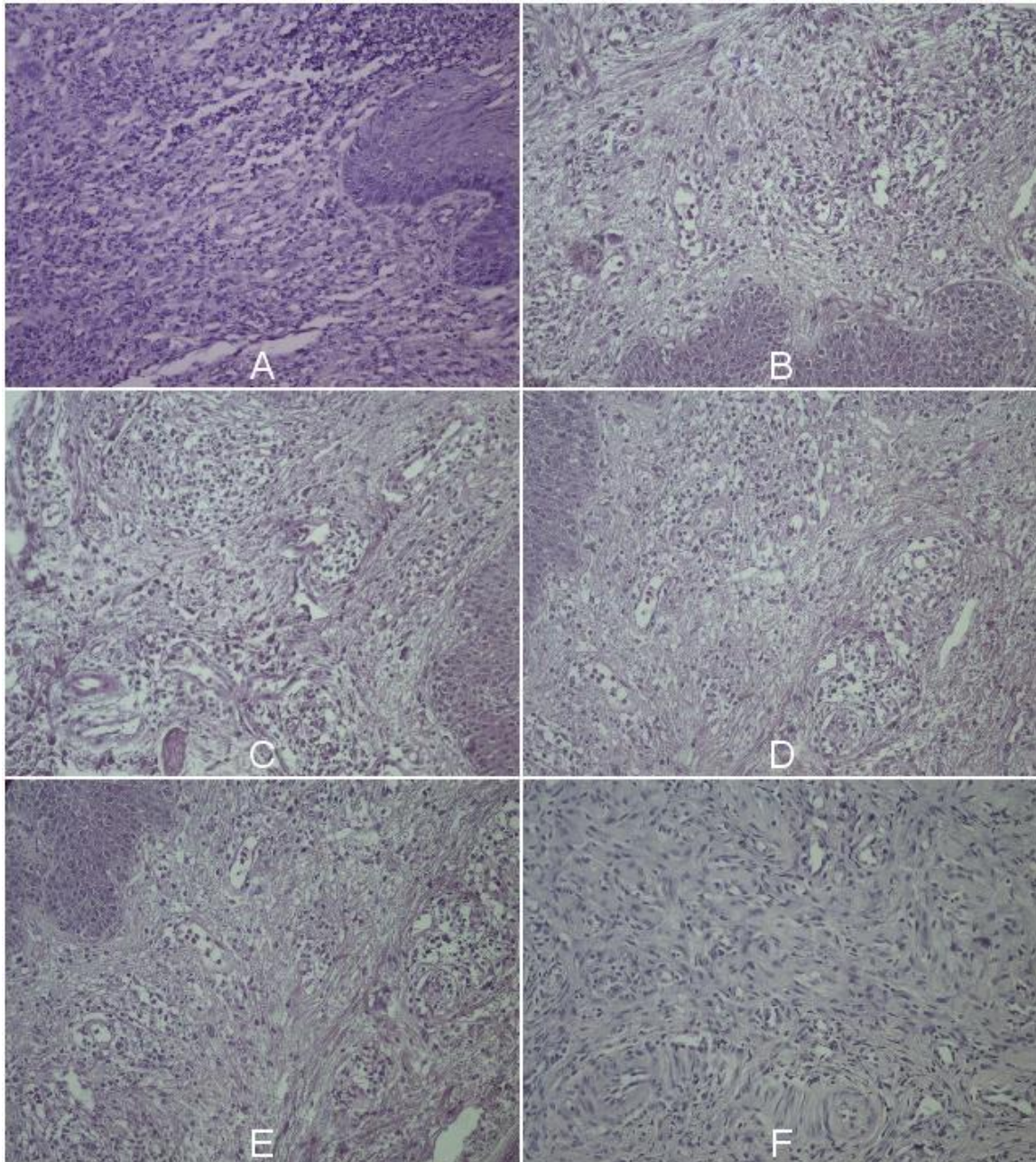
Epitel sa periferije defekta veoma rano u toku zarastanja počinje da migrira i prerasta koagulum koji inicijalno ispunjava ekstrakcionu ranu. Kompletne epitelizacije alveolarnog grebena zabeležena je već sedmog dana kod većine životinja, a u grupi tretiranoj KU kod svih eksperimentalnih životinja (Slika 7D). Bazalna membrana mladog skvamoznog epitela ispoljava slabu PAS pozitivnost. Epitel je u K I NL grupi bio tanak (Slika 9A i B), sačinjen od 2-5 slojeva slabo orožavajućih keratinocita iznad kubičnog bazalnog sloja, dok je u grupama tretiranim antioksidansima u slobodnom i u nanolipozome enkapsuliranom obliku bio deblji i jasnije stratifikacije (Slika 9C-F). U skvamoznom epitelu gingive uočena je egzocitoza zapaljenskih ćelija u prerastajući epitel, i to uglavnom polimorfonuklearnih leukocita i malobrojnih limfocita. Ova infiltracija epitela je bila najizraženija u K i NL grupi (Slika 8A i B).

Akutni zapaljenski odgovor može se verifikovati već unutar 24 sata od ekstrakcije. U mekom tkivu periodoncijuma zapaža se akutna inflamacija sa infiltracijom neutrofilima i makrofagima, kao i edemom vezivnog tkiva, usled eksudacije plazme kroz traumatski oštećene i patološki propustljive krvne sudove. Pored edema sa raslojavanjem prisutnih kolagenih vlakana i hiperemije krvnih sudova, dominira neutrofilna infiltracija (Slika 8A i B).

Na uzorcima dobijenim sedmog dana posle ekstrakcije na analiziranim histološkim presecima svih eksperimentalnih grupa utvrđeno je prisustvo zapaljenskog infiltrata i granulacionog tkiva u gingivalnom i periodoncialnom vezivnom tkivu. Infiltracija inflamatornim ćelijama bila je globalno najizraženija u K i NL grupi (Slika 8A i B). Zapaljenski infiltrat sačinjen je iz makrofaga, krupnih, ovalnih jedara homogenog hromatina i brojnih polimorfonuklearnih leukocita segmentisanih, heterohromnih jedara. Uočeno je i prisustvo ekstravaziranih eritrocita, dok su limfociti sitnih tamnoplavih jedara malobrojni. Na dva uzorka, jednom iz grupe Q<sub>10</sub> i jednom iz grupe KU (Slika 8C i D), zabeleženo je i prisustvo pojedinačnih džinovskih multinuklearnih ćelija sa 3-5 jedara difuzno raspoređenih po obilnoj citoplazmi. Zapaljenski infiltrat je fokalno mrljasto aglomerisan, dok je u nekim od uzoraka (K i NL grupa) uočeno prisustvo mikroapscesa, sa lokalnom destrukcijom i neprepoznatljivošću tkivnih elemenata, kao i nagomilavanjem neutrofilnih leukocita pretvorenih u piogena telašca (Slika 8A i B). Inflamatorna infiltracija bila je nešto slabije izražena u grupama gde je primenjena lokalna aplikacija koenzima Q<sub>10</sub> i KU (Slika 8C i D). Najmanje izražen zapaljenski infiltrat zabeležen je u grupi kojoj je aplikovan Q<sub>10</sub> enkapsuliran u lipozome (Slika 8E). Značajnija razlika nije zabeležena između grupa gde je primenjen slobodan i KU enkapsuliran u lipozome (Slika 8D i F).



**Slika 8.** Histološki izgled procesa zarastanja mekih tkiva rane sedmog dana posle ekstrakcije zuba: A - kontrolna grupa (K), B - prazni nanolipozomi (NL), C - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> (Q<sub>10</sub>), D - tretman kurkuminom (KU), E - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> enkapsuliranim u nanolipozome (NLQ<sub>10</sub>) i F - tretman kurkuminom enkapsuliranim u nanolipozome (NLKU). Hematoksilin-eozin bojenje, originalno uvećanje x200.



**Slika 9.** Zarastanje mekih tkiva rane sedmog dana posle ekstrakcije zuba: A - kontrolna grupa (K), B - prazni nanolipozomi (NL), C - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> (Q<sub>10</sub>), D - tretman kurkuminom, E - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> enkapsuliranim u nanolipozome (NLQ<sub>10</sub>) i F - tretman kurkuminom enkapsuliranim u nanolipozome (NLKU). AB-PAS histohemijsko bojenje, originalno uvećanje x200.

Na analiziranim preparatima u svim isečcima uočava se u periodoncijumu uz ivice defekta prisustvo mladog granulacionog tkiva sa obiljem novoformiranih krvnih sudova. Novoformirani krvni sudovi su sitni, dominantno obloženi angioblastima, nezrelim endotelnim ćelijama čija su jedra ovalna, ispupčena i prominiraju u lumen kapilara. Usled nezrelosti interendotelnih veza i bazalne membrane, kao i deficita pericita koji spolja stabilizuju kapilarne krvne sudove, novostvoreni krvni sudovi su izrazito propustljivi, te je markatan izrazito edematozan izgled tkiva. Novoformirani krvni sudovi su utopljeni u amorfnu osnovnu supstancu, sa malom količinom vezivnotkivnih vlakana. Oko krvnih sudova prisutne su ćelije zapaljenja i mezenhimne ćelije, ovalnih do izduženih jedara, slabo izraženih ćelijskih granica, koje mikromorfološki odgovaraju dominantno fibroblastima i u manjem broju fibrocitima, čija su jedra vretenasta i tamna. Fokalno se zapažaju mitoze u ovim ćelijama (Slika 8). Fibroblasti se ne mogu morfološki razlikovati od miofibroblasta koji su takođe prisutni. Ove ćelije pokazuju fenotipska svojstva i fibroblasta i glatkomišićnih ćelija i aktivno sekretuju komponente ekstracelularnog matriksa i učestvuju u kontrakciji rane, koja započinje veoma rano.

Semikvantitativnom analizom određivan je procenat rasprostranjenosti granulacionog tkiva u odnosu na celokupnu površinu preseka mekog tkiva periodoncijuma (Tabela 1, Grafikon 1). Na uzorcima dobijenim od životinja tretiranih koenzimom Q<sub>10</sub> i kurkuminom obim granulacionog tkiva je bio nešto manji nego u netretiranim grupama, međutim bez značajnih razlika (Slika 8C i D).

Osnovna supstanca vezivnog tkiva je rasvetljenog izgleda, edematozna, sa gubitkom fibrilarne organizacije kolagenih snopova. Prisutna je rastresita mreža nežnih, nascentnih kolagenih vlakana (Grafikon 2, Tabela 2), koja se na Trichrom Masson bojenju prebojavaju svetloplavo (Slika 10), a Van Giesonovim bojenjem dobijaju blede crvenu boju (Slika 11). Ostaci periodontalnog ligamenta se fokalno uočavaju perialveolarno, a najvećim delom je granica između periodoncijalnog tkiva i alveolarnog sakusa nejasna, jer je sakus ispunjen koagulumom u organizaciji, dok se u njegovim bazalnim delovima uočavaju trabekule osteoida.

Na analiziranim histološkim presecima alveolarni sakus je bio u potpunosti ispunjen granulacionim tkivom, zamenjujući ugrušak koji je inicijalno ispunjavao alveolu. Ovo granulaciono tkivo nastalo je urastanjem fibroblasta i krvnih sudova sa periferije, iz ostataka periodontalnog ligamenta. U alveoli se mezenhimalne ćelije organizuju u gustu mrežu, sa brojnim krvnim sudovima i kolagenim vlaknima. Na histološkim uzorcima uočena je početna mineralizacija, sa progresivnim deponovanjem prstolikih formacija nezrele kosti unutar matriksa. U alveoli su verifikovane trabekule koštanog tkiva sa sekundarnim osteonima, okružene medularnim prostorima bogatim krvnim sudovima, adipocitima, mezenhimnim i zapaljenskim ćelijama.

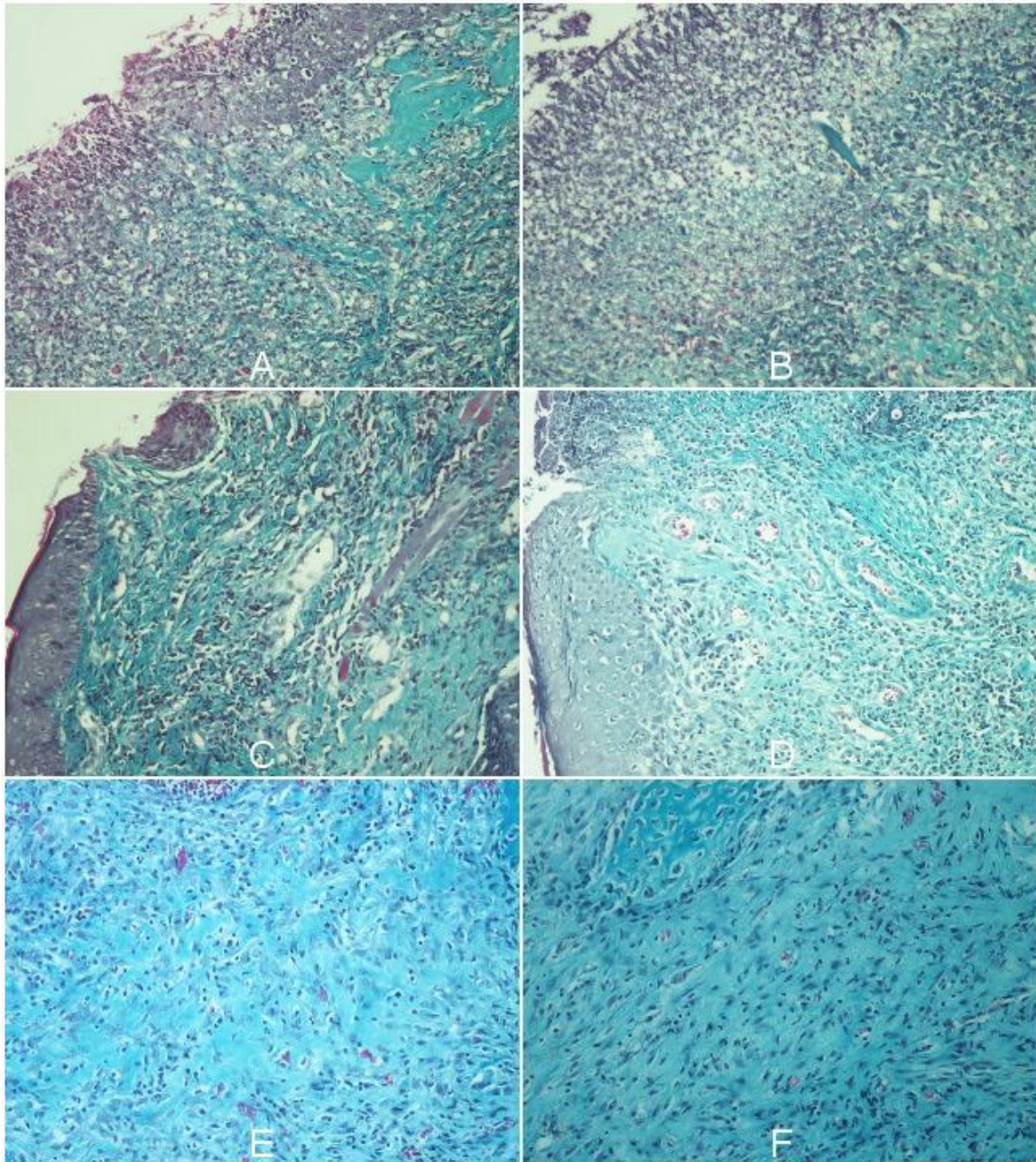
**Tabela 1.** Pojedinačni i ukupni patohistološki skor u tkivu koje okružuje ekstrakcionu ranu 7 dana posle ekstrakcije zuba

Eksperimentalna grupa	Inflamatorni infiltrat	Granulaciono tkivo	Angiogeneza	Ukupni skor
K	6	6	4,5	16,5
NL	5	6	5	16
Q <sub>10</sub>	3	4,5	6	13,5
KU	4	5	5	14
NLQ <sub>10</sub>	3	6	4,5	13,5
NLKU	3,5	4,5	4,5	12,5

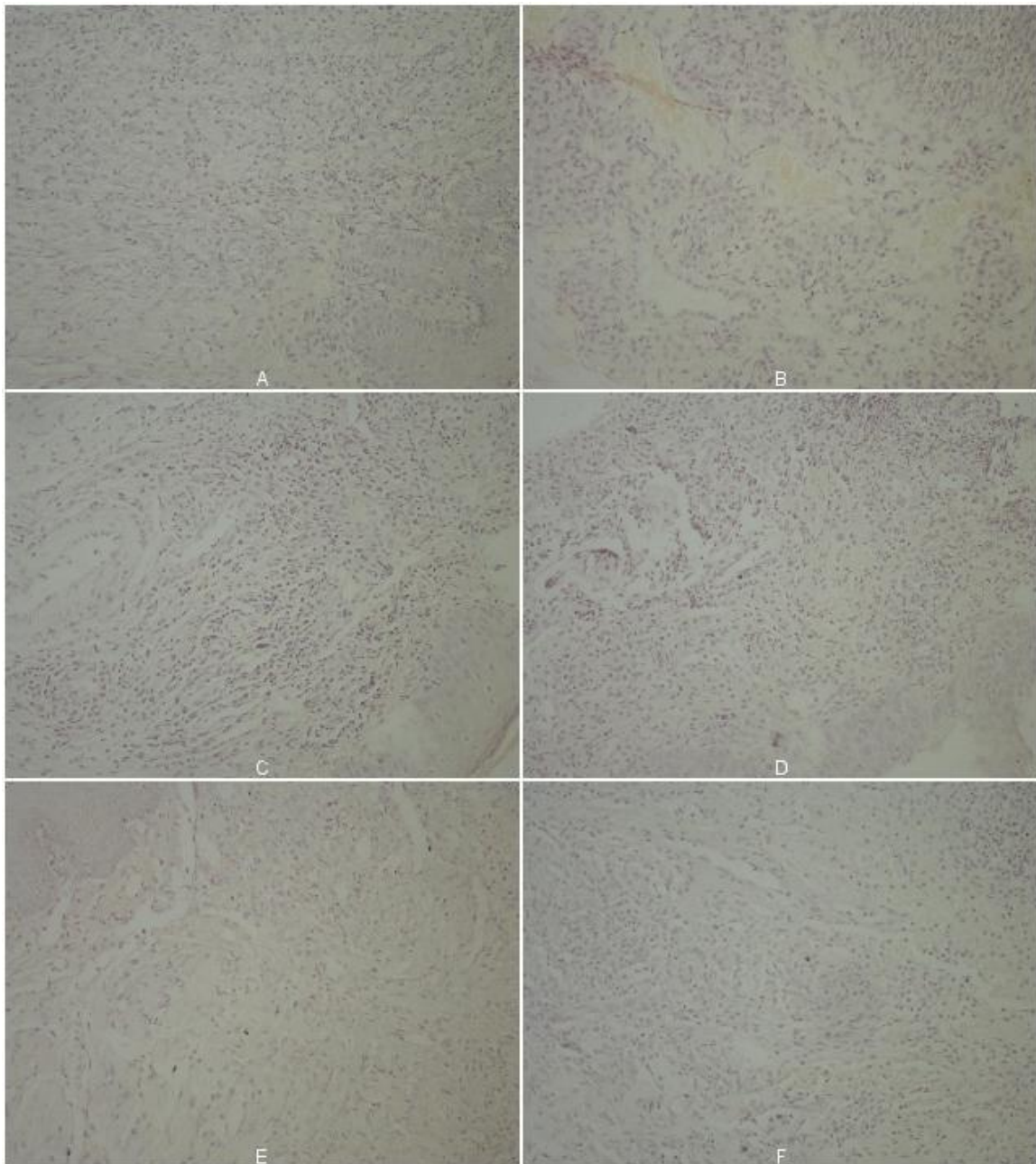
**Tabela 2.** Patohistološki skor fibroze ožiljnog tkiva određen za eksperimentalne grupe i kontrolnu grupu 7 dana posle ekstrakcije zuba pacova

Eksperimentalna grupa	K	NL	Q <sub>10</sub>	KU	NLQ <sub>10</sub>	NLKU
Skor fibroze	6	6	5	4,5	4	3,5





**Slika 10.** Zarastanje mekih tkiva postekstrakcione rane, sedmi dan posle intervencije: A - kontrolna grupa (K), B - prazni nanolipozomi (NL), C - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> (Q<sub>10</sub>), D - tretman kurkuminom (KU), E - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> enkapsuliranim u nanolipozome (NLQ<sub>10</sub>) i F - tretman kurkuminom enkapsuliranim u nanolipozome (NLKU). Masson Trichrom histohemijsko bojenje, originalno uvećanje x200.



**Slika 11.** Zarastanje mekih tkiva rane sedmog dana posle ekstrakcije zuba: A - kontrolna grupa (K), B - prazni nanolipozomi (NL), C - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> (Q<sub>10</sub>), D - tretman kurkuminom (KU), E - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> enkapsuliranim u nanolipozome (NLQ<sub>10</sub>) i F - tretman kurkuminom enkapsuliranim u nanolipozome (NLKU). Van Gieson histohemijsko bojenje, originalno uvećanje x200.

Trabekule nezrele kosti su se bojile intenzivno plavom bojom na trihromnom bojenju (Slika 3), dok su na presecima histohemijski obrađenim po Van Giesonu imale jasnu crvenu prebojenost (Slika 11), usled gusto i kompaktno aranžiranih snopova kolagenih vlakana. Duž grebenova alveolarne kosti uočena je akumulacija osteoklasta, krupnih multinuklearnih ćelija okruženim rasvetljenim pojasom duž ćelijske margine orjentisane ka alveolarnom koštanom tkivu maksile.

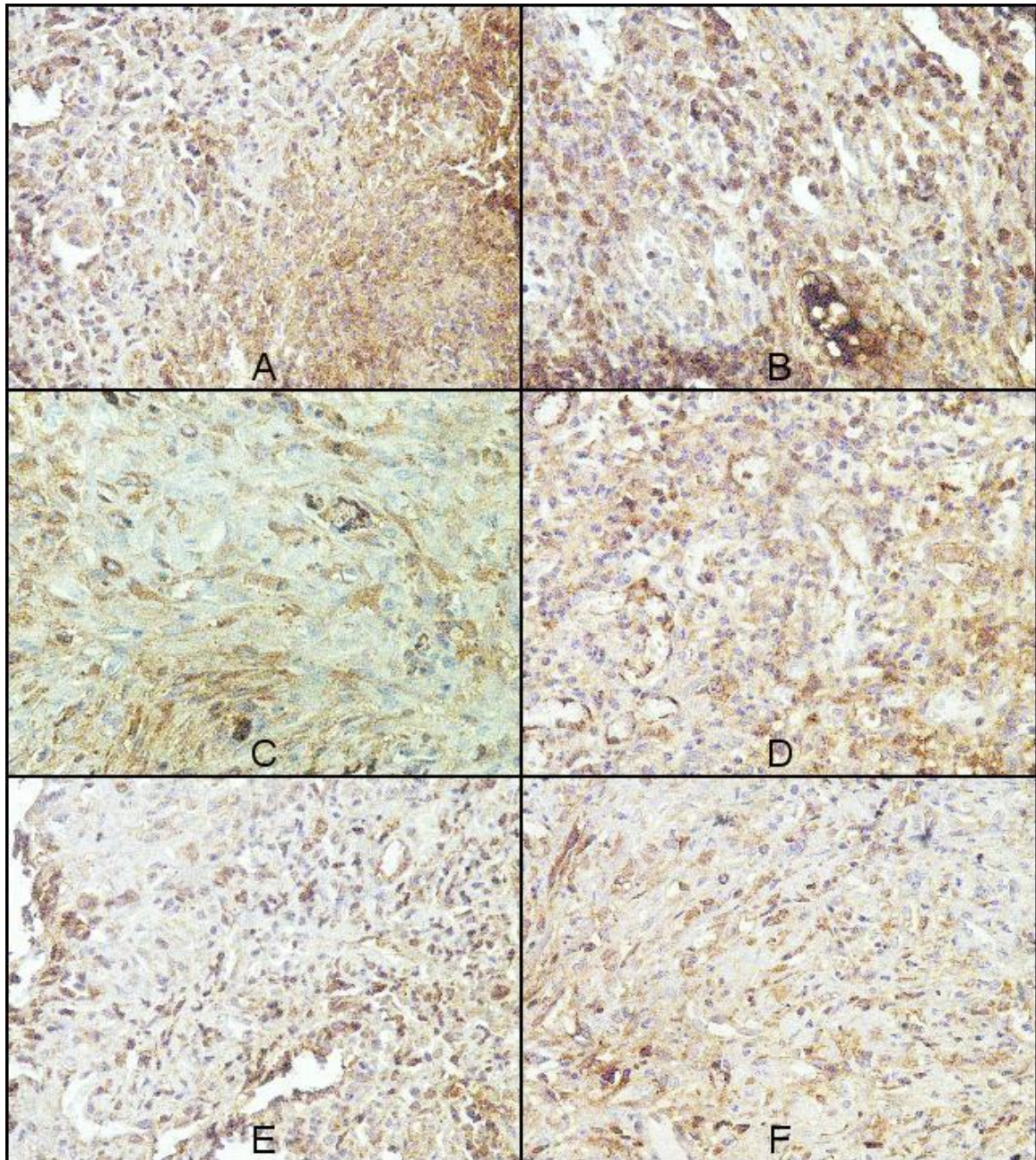
Na histološkim presecima dobijenim žrtvovanjem eksperimentalnih životinja 7. dana zabeležena je visoka ekspresija osteopontina u inflamatornom infiltratu i mladom vaskularnom granulacionom tkivu u okolini ekstrakcione rane (Slika 12). Povećana ekspresija osteopontina udružena je sa zapaljenskim odgovorom pri zarastanju defekta. Na histološkim uzorcima ekspresija osteopontina jasno prati prostor koji zauzima granulaciono tkivo, praktično markirajući delove u kojima se zapaljenje najizraženije i gde se odvija intenzivna reparacija tkiva.

Pozitivno bojenje prisutno je u inflamatornim ćelijama, pre svega makrofagima obilne citoplazme i ovalnih, euhromatičnih jedara, a u manjoj meri i u neutrofilnim granulocitima. Osteopontinska ekspresija prisutna je u većini mezenhimskih ćelija, ovoidnog do vretenastog oblika, koje proliferišu sa ivica defekta i oko ognjišta najintenzivnijeg zapaljenja. Ove ćelije odgovaraju najverovatnije fibroblastima, dok bi bar jednu malu frakciju mogle da čine mikromorfološki fibroblastima srodne miofibroblastne ćelije i periciti. Endotel mladih, nezrelih kapilara takođe je pozitivan na osteopontinsko bojenje. Intenzitet ekspresije osteopontina direktno korelira sa veličinom oblasti koju u rani zauzima granulaciono tkivo. Nešto intenzivnije bojenje uočava se na samim ivicama defekta.

Osteopontinska ekspresija slabog intenziteta uočava se i u epidermu koji epitelizuje, varijabilno zahvatajući od bazalnog sloja do cele debljine mladog, formirajućeg epitela. Intenzitet osteopontinske ekspresije značajno varira između ispitivanih grupa. Imunoreaktivnost na osteopontin najveća je u grupama K, NL i Q<sub>10</sub> (Slika 12A-C). U njima se beleži najveća gustina osteopontin pozitivnih ćelija, kao i najveći obim polja koji zahvataju. U grupi Q<sub>10</sub> distribucija osteopontinske aktivnosti u mekom tkivu rane je velikog obima kao u netretiranim grupama, ali je nešto slabijeg intenziteta (Slika 12C).

U grupama NLQ<sub>10</sub> i KU primetna je značajna redukcija ekspresije osteopontina (Slika 12D i E), dok na uzorcima dobijenim iz grupe NLKU je evidentno smanjena i predstavljena bojenjem slabog intenziteta rasutih ćelija histiocitne i fibroblastne morfologije (Slika 12F). Ovaj markatno redukovani intenzitet bojenja dolazi do izražaja u obilnoj citoplazmi džinovskih multinuklearnih ćelija tipa stranog tela koje su rasute u polju reparacije na jednom od uzoraka iz ove grupe.

U alveolarnom sakusu koji ispunjava gusto granulaciono tkivo prisutna je veoma izražena osteopontinska ekspresija, koja markira gustu mrežu krupnih mezenhimnih ćelija sa izduženim nastavcima. Osteoblasti koji deponuju nežne lamele osteoida i nezrele kosti pokazuju jaku pozitivnost na osteopontin.



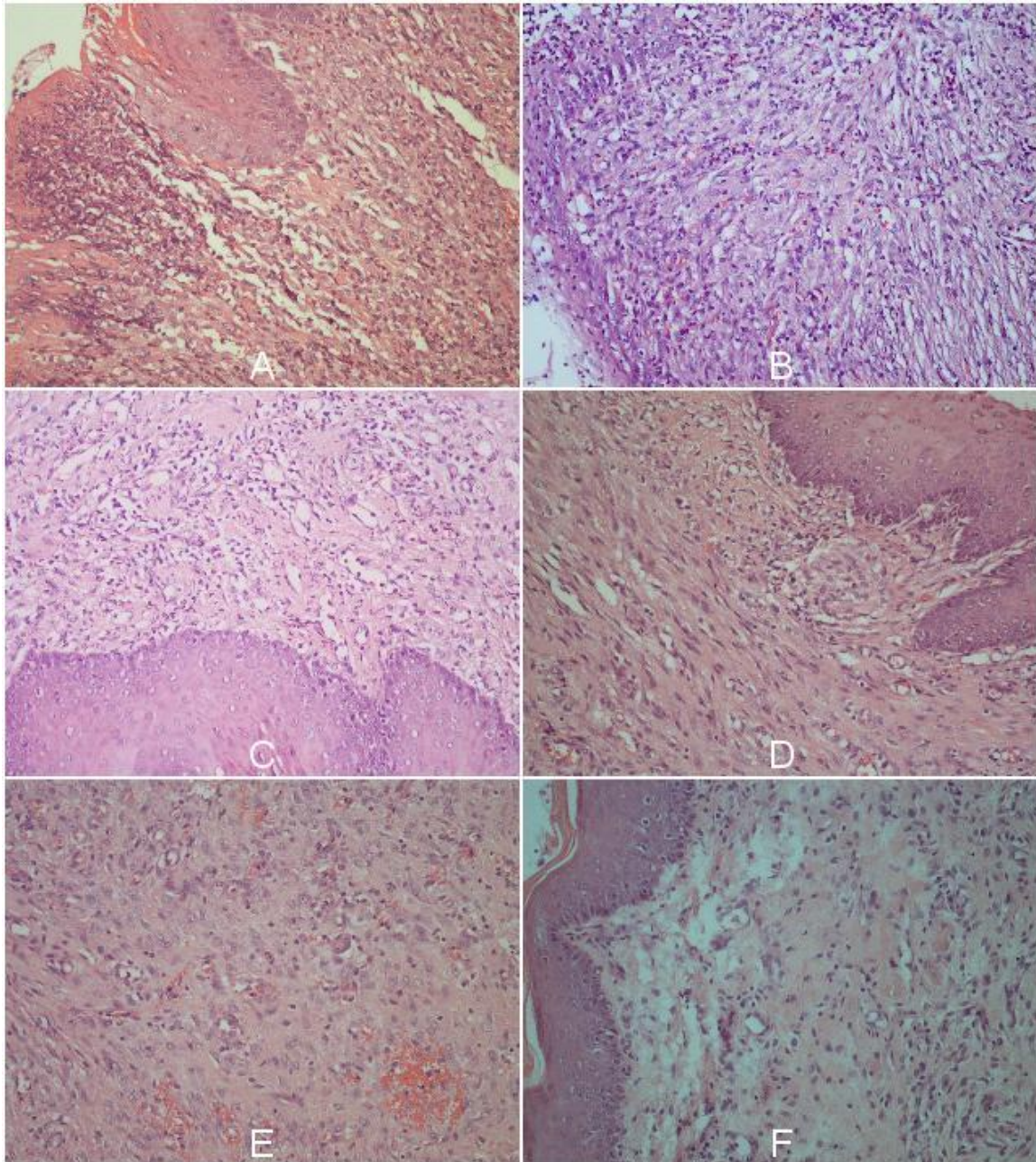
**Slika 12.** Imunohistohemijaska ekspresija Osteopontina u zarastajućem mekom tkivu rane sedmog dana posle ekstrakcije zuba: A - kontrolna grupa (K), B - prazni nanolipozomi (NL), C - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> (Q<sub>10</sub>), D - tretman kurkuminom (KU), E - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> enkapsuliranim u nanolipozome (NLQ<sub>10</sub>) i F - tretman kurkuminom enkapsuliranim u nanolipozome (NLKU). Originalno uvećanje x400.

### ***5.1.2. Patohistoška i imunohistohemijska analiza isečaka mekog tkiva rane četrnaest dana posle ekstrakcije zuba***

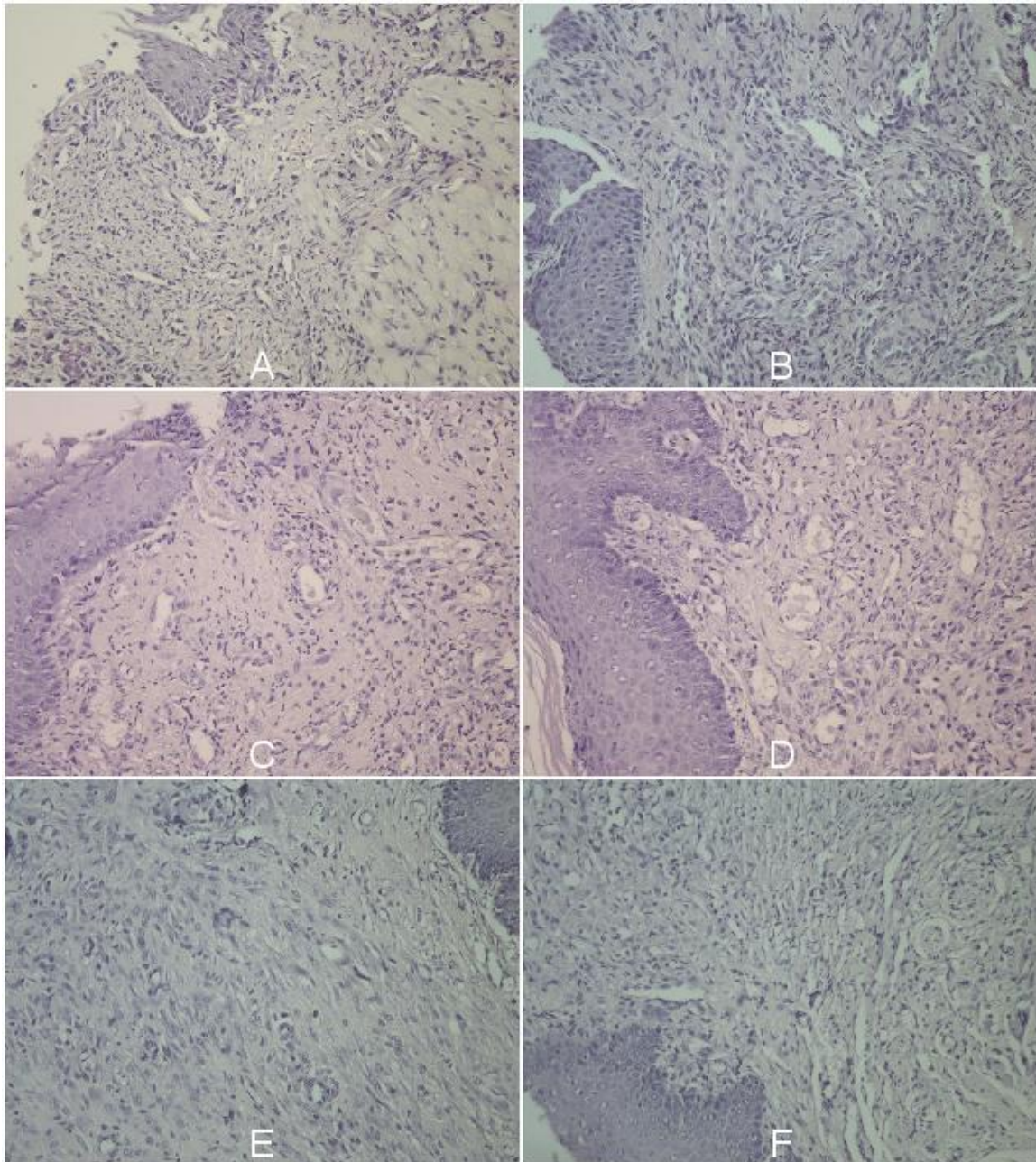
Mikromorfološkom analizom uzoraka dobijenih žrtvovanjem eksperimentalnih životinja 14. dana posle ekstrakcije zuba uočeno je histološko napredovanje procesa reparacije postekstrakcione rane, sa sazrevanjem granulacionog tkiva, povećanom depozicijom kolagenih vlakana i redukcijom zapaljenskog infiltrata (Slika 13, Tabela 3 i 4, Grafikon 1).

Skvamozni epitel u sazrevanju prekrivao je u celini ekstrakcionu ranu kod svih ispitivanih životinja, tj. epitelno zatvaranje defekta je bilo kompletno u svim ispitivanim grupama. Značajnija egzocitoza zapaljenskih ćelija, dominantno limfocita, zabeležena je na jednom od uzoraka iz K i NL grupe (Slika 13A i B). Bazalna membrana epitela je jasnije definisana, sa fokalnom diskretnom kolagenizacijom subepitelno. Mestimično se uočava papilomatoza, sa talasastom epitelno-subepitelnom granicom (Slika 14A-F).

Na uzorcima dobijenim 14. dana posle ekstrakcije maksilarnih inciziva značajno je redukovana zapaljenska infiltracija. Najupadljivije je smanjen broj polimorfonuklearnih leukocita (Tabela 3, Grafikon 1). Oni su prisutni pojedinačno i u klasterima od po nekoliko ćelija uz same margine alveolarnog sakusa. Neutrofili su značajno brojniji u uzorcima iz K i NL grupe (Slika 13A i B) u odnosu na grupe kod kojih su aplikovani antioksidansi. Gotovo potpuno iščezavanje polimorfonukleara iz inflamatornog infiltrata registruje se u grupi kojoj je nanošena formulacija CoQ<sub>10</sub> u nanolipozomima (NLQ<sub>10</sub> grupa) (Slika 13E). Izraženije je prisustvo makrofaga, a uočavaju se i limfociti, najbrojniji na demarkacionom rubu rane prema okolnom neozleđenom mekom tkivu.



**Slika 13.** Histološki izgled procesa zarastanja mekih tkiva rane, 14. dana posle ekstrakcije zuba: A - kontrolna grupa (K), B - prazni nanolipozomi (NL), C - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> (Q<sub>10</sub>), D - tretman kurkuminom (KU), E - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> enkapsuliranim u nanolipozome (NLQ<sub>10</sub>) i F - tretman kurkuminom enkapsuliranim u nanolipozome (NLKU). Hematoksilin-eozin bojenje, originalno uvećanje x200.



**Slika 14.** Zarastanje mekih tkiva rane 14. dana posle ekstrakcije zuba: A - kontrolna grupa (K), B - prazni nanolipozomi (NL), C - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> (Q<sub>10</sub>), D - tretman kurkuminom, E - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> enkapsuliranim u nanolipozome (NLQ<sub>10</sub>) i F - tretman kurkuminom enkapsuliranim u nanolipozome (NLKU). AB-PAS histohemijsko bojenje, originalno uvećanje x200.



**Tabela 3.** Pojedinačni i ukupni patohistološki skor u tkivu koje okružuje postekstrakcionu ranu 14 dana posle ekstrakcije zuba

Eksperimentalna grupa	Inflamatorni infiltrat	Granulaciono tkivo	Angiogeneza	Ukupni skor
K	4	5	5	14
NL	4	4,5	5	13,5
Q10	3	4,5	3,5	11
KU	2,5	4	2	8,5
NLQ10	2	4	1	7
NLKU	1,5	3,5	2	7

**Tabela 4.** Patohistološki skor fibroze ožiljnog tkiva određen za eksperimentalne grupe i kontrolnu grupu 14 dana posle ekstrakcije zuba pacova

Eksperimentalna grupa	K	NL	Q <sub>10</sub>	KU	NLQ <sub>10</sub>	NLKU
Skor fibroze	5,5	5	4,5	4	2,5	2,5

Granulaciono tkivo zauzima značajno manju površinu u polju postekstrakcione rane, tj. evidentiraju se histološki znaci kontrakcije rane, verovatno uslovljene prisustvom miofibroblasta u tkivu. Granulaciono tkivo je dominantno fibrovaskularnog karaktera, sa bolje definisanim lumenovima novoformiranih krvnih sudova. Krvne sudove delimično oblažu angioblasti u sazrevanju, dok su neki obloženi endotelnim ćelijama, spljoštenih, izduženih, heterohromnih jedara. Perivaskularni prostori su širi i u njima se uočavaju strukturisaniji snopovi kolagenih vlakana, koji formiraju lošije i bolje definisane snopove, dok su oko njih prisutni brojni fibroblasti i fibrociti. Bojenjem po Massonu i Van Giesonu (Slika 15 i 16) intenzitet obojenosti kolagene komponente vezivnog tkiva plavom, odnosno crvenom bojom je veći nego na histološkim presecima dobijenim sedmog postekstrakcionog dana.

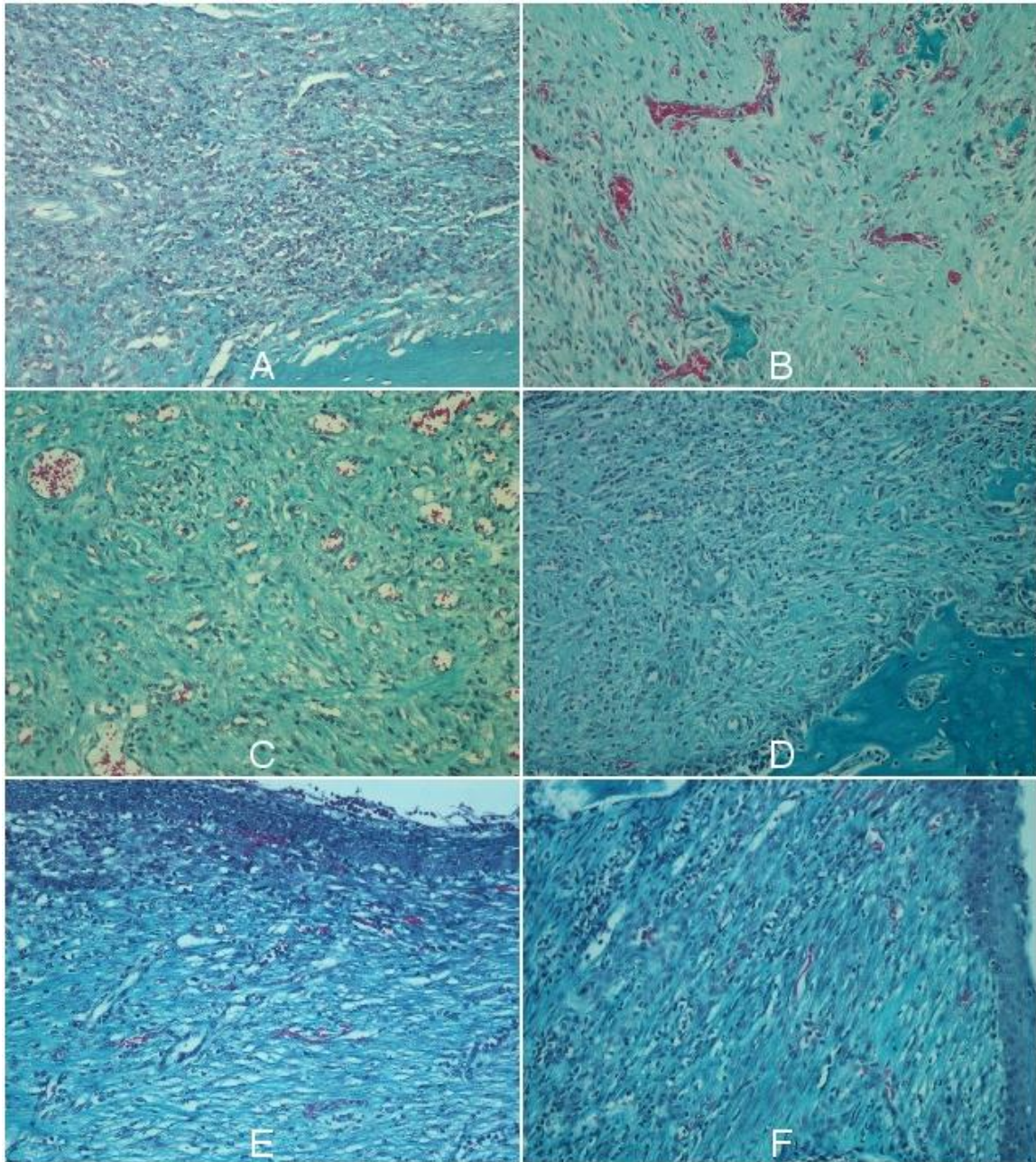
U uzorcima iz NLQ<sub>10</sub> i NLKU grupa verifikuje se prisustvo mešavine fibrovaskularnog i zrelog, fibroznog granulacionog tkiva sa jasno definisanim krvnim sudovima, diskretnim zapaljenskim infiltratom i debelim, gustim kolagenim snopovima (Slika 15F i G, Slika 16F i G, Grafikon 2, Tabela 4). Nasuprot tome, u grupi K prisutno je dominantno fibrovaskularno granulaciono tkivo (Slika 15A i 16A). Edem strome je slabo izražen, osnovna supstanca je komprimovana i organizovana depozicijom kolagenih vlakana. Periodontalni ligament je u potpunosti degradiran, te se više ne

raspoznaje. U alveolarnom sakusu je izražena fibroplazija, sa penetracijom novoformiranih krvnih sudova do centra prvobitnog koaguluma. Trabekule osteoida šire se unutar alveole u celini, dok se u nivou kortikalne margine alveolarnog sakusa uočava osteoklastna resorpcija.

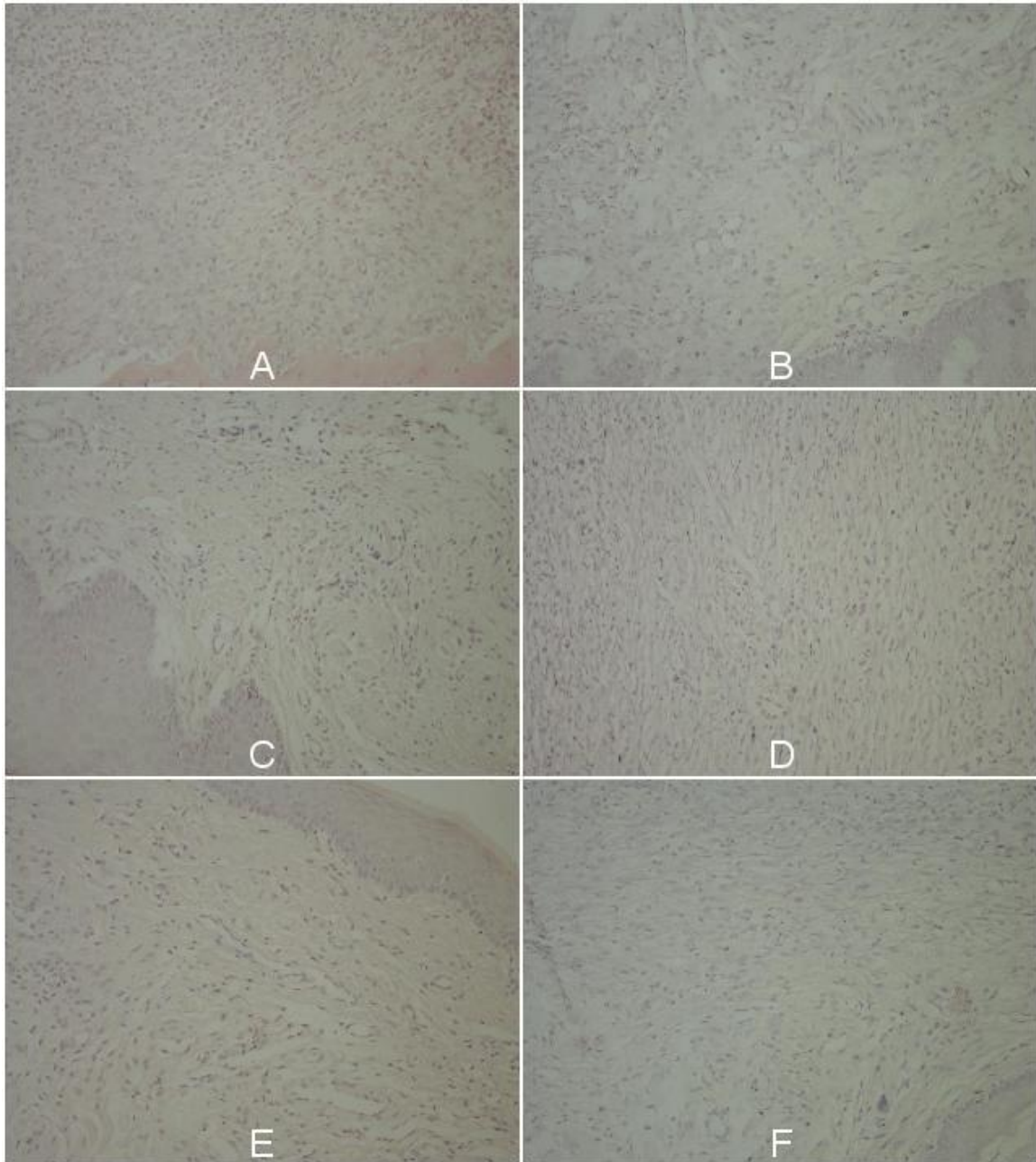
Ekspresija osteopontina u najvećoj meri prati distribuciju granulacionog tkiva koje sazreva i redukuje se u zapremini. U uzorcima iz grupe K i NL, snižavanje osteopontinske ekspresije u odnosu na 7. dan je diskretno i samo slabo izraženo (Slika 17A i B). U grupama Q<sub>10</sub> i KU evidentan je pad imunohistohemijske pozitivnosti (Slika 17C i D). Značajno je smanjen broj ćelija koje eksprimiraju osteopontin, a i njihova morfologija se menja. Veću frakciju osteopontin pozitivnih ćelija sada čine vretenaste, fibroblastolike ćelije sa manjim brojem tkivnih makrofaga, dok se polimorfonukleari izrazito retko uočavaju.

U uzorcima eksperimentalnih grupa NLKU i NLQ<sub>10</sub> stepen osteopontinske ekspresije je najniži, i prema obimu zahvatanja, kao i u odnosu na intenzitet hromogenkog signala (Slika 17E i F). Naime, braon prebojavanje se dominantno registruje u vidu grudvastog i zrnastog citoplazmatskog prebojavanja, dok je na kraju 7. dana bojenje bilo jasno difuzno raspoređeno unutar ćelije, jasno markirajući njen celokupni volumen.

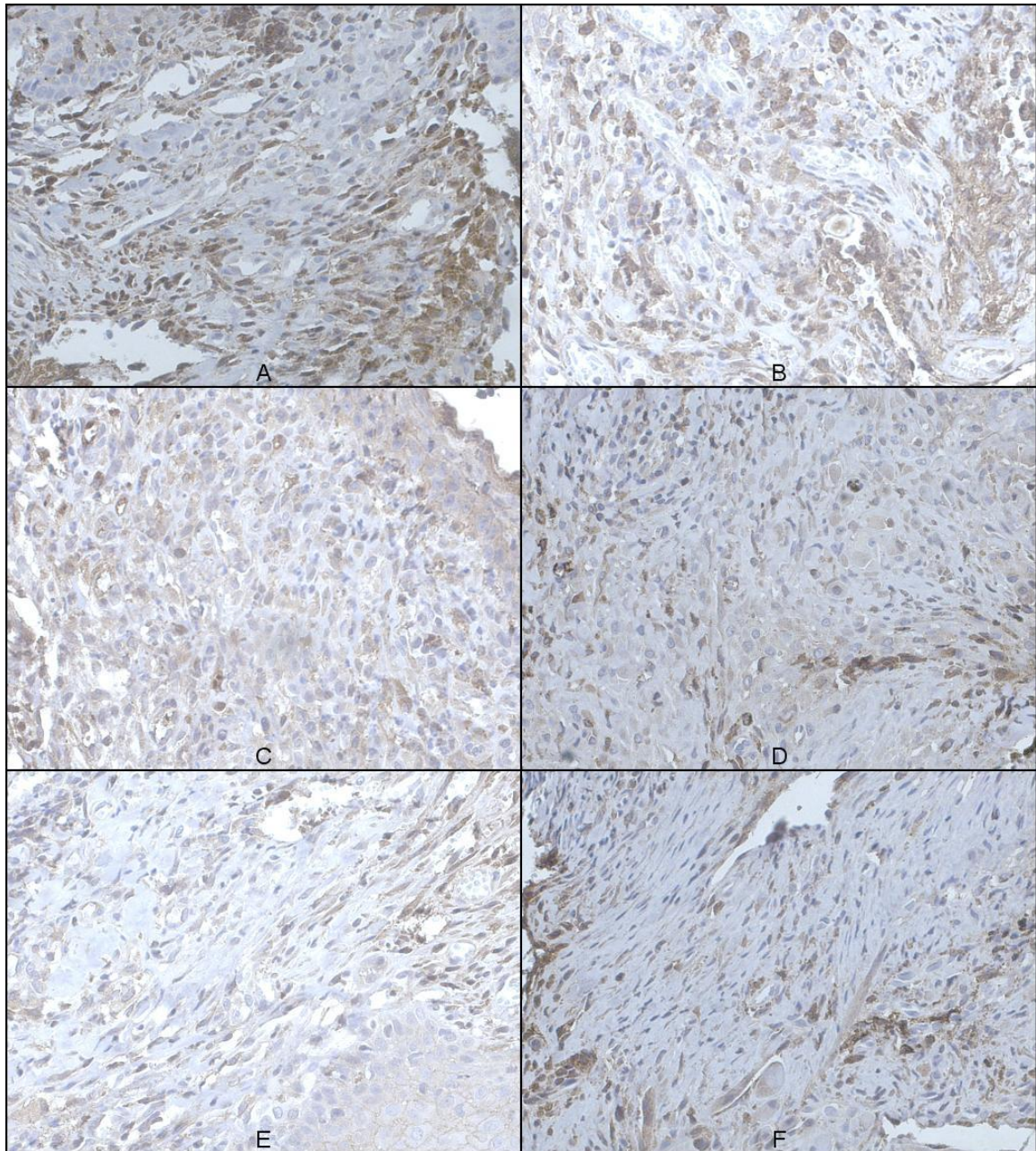
Najveća razlika u osteopontinskom sadržaju, u vidu dramatičnog pada ekspresije, viđena je u grupi NLQ<sub>10</sub> u odnosu na nivo ekspresije zabeležen 7. dana u istoj grupi (Slika 17E). Epidermalni keratinociti eksprimiraju osteopontin u bazalnoj polovini epitela u grupama K, NL i Q<sub>10</sub>, dok je u ostalim grupama osteoblastna aktivnost u potpunosti odsutna, ili se beleži u pojedinačnim nasumično distribuiranim ćelijama.



**Slika 15.** Zarastanje mekih tkiva postekstrakcione rane, 14. dana posle ekstrakcije zuba: A - kontrolna grupa (K), B - prazni nanolipozomi (NL), C - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> (Q<sub>10</sub>), D - tretman kurkuminom (KU), E - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> enkapsuliranim u nanolipozome (NLQ<sub>10</sub>) i F - tretman kurkuminom enkapsuliranim u nanolipozome (NLKU). Masson Trichrom histohemijsko bojenje, originalno uvećanje x200.



**Slika 16.** Zarastanje mekih tkiva rane 14. dana posle ekstrakcije zuba: A - kontrolna grupa (K), B - prazni nanolipozomi (NL), C - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> (Q<sub>10</sub>), D - tretman kurkuminom (KU), E - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> enkapsuliranim u nanolipozome (NLQ<sub>10</sub>) i F - tretman kurkuminom enkapsuliranim u nanolipozome (NLKU). Van Gieson histohemijsko bojenje, originalno uvećanje x200.



**Slika 17.** Imunohistohemijska ekspresija Osteopontina u zarastajućem mekom tkivu rane 14. dana posle ekstrakcije zuba: A - kontrolna grupa (K), B - prazni nanolipozomi (NL), C - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> (Q<sub>10</sub>), D - tretman kurkuminom (KU), E - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> enkapsuliranim u nanolipozome (NLQ<sub>10</sub>) i F - tretman kurkuminom enkapsuliranim u nanolipozome (NLKU). Originalno uvećanje x400.

### 5.1.3. Patohistoška i imunohistohemijska analiza isečaka mekog tkiva rane dvadeset i jedan dan posle ekstrakcije zuba

Kod životinja žrtvovanih 21. dana, na histološkim presecima postekstrakcione rane uočena je keratinizacija pokrovnog epitela, a mestimično je prisutna slika papilomatoze, sa izrazito valovitom konturom bazalne membrane i epitelnim produžecima zaobljenih vrhova koji uranjaju u subepitelno vezivno tkivo (Slika 18 i 19, Tabela 5, Grafikon 1). Ispod bazalne membrane i oko prečki dobro razvijenog skvamoznog epitela uočava se fokalno diskretna do umerena fibroza, sa paralelno raspoređenim snopovima kolagenih vlakana koji prate konturu bazalne membrane. Mestimično epitel pokazuje znake akantozе, sa zadebljanjem epitela u celini usred većeg broja slojeva spinoznih keratinocita, kao i znake hipergranuloze, sa širokim granuloznim slojem epitela subkornealno.

Inflamacija je oskudna, zapaljenski infiltrat se jasno uočava samo na histološkim uzorcima iz grupe K i NL (Slika 18A i B). U ovim grupama se još uvek može uočiti prisustvo pojedinačnih i malobrojnih polimorfonuklearnih leukocita, kao i na nekim od uzoraka iz eksperimentalne grupe u kojoj su životinje tretirane CoQ<sub>10</sub> (Slika 18C). U ostalim grupama zapaljenski infiltrat čine zreli limfociti i pojedinačni tkivni makrofagi, dok su polimorfonukleari veoma retki (Slika 18D-F). Broj krvnih sudova je veoma redukovan. Zidovi kapilara, venula i arteriola su jasno definisani, sa kontinualnom bazalnom membranom i mestimično diskretnom perivaskularnom fibrozom.

**Tabela 5.** Pojedinačni i ukupni patohistološki skor u tkivu koje okružuje postekstrakcionu ranu 21 dan posle ekstrakcije zuba

Eksperimentalna grupa	Inflamatorni infiltrat	Granulaciono tkivo	Angiogeneza	Ukupni skor
K	1,5	2,5	2,5	6,5
NL	1,5	2	2	5,5
Q10	1	1,5	1	3,5
KU	2	1,5	1	4,5
NLQ10	0	1	0	1
NLKU	0,5	1	0,5	2

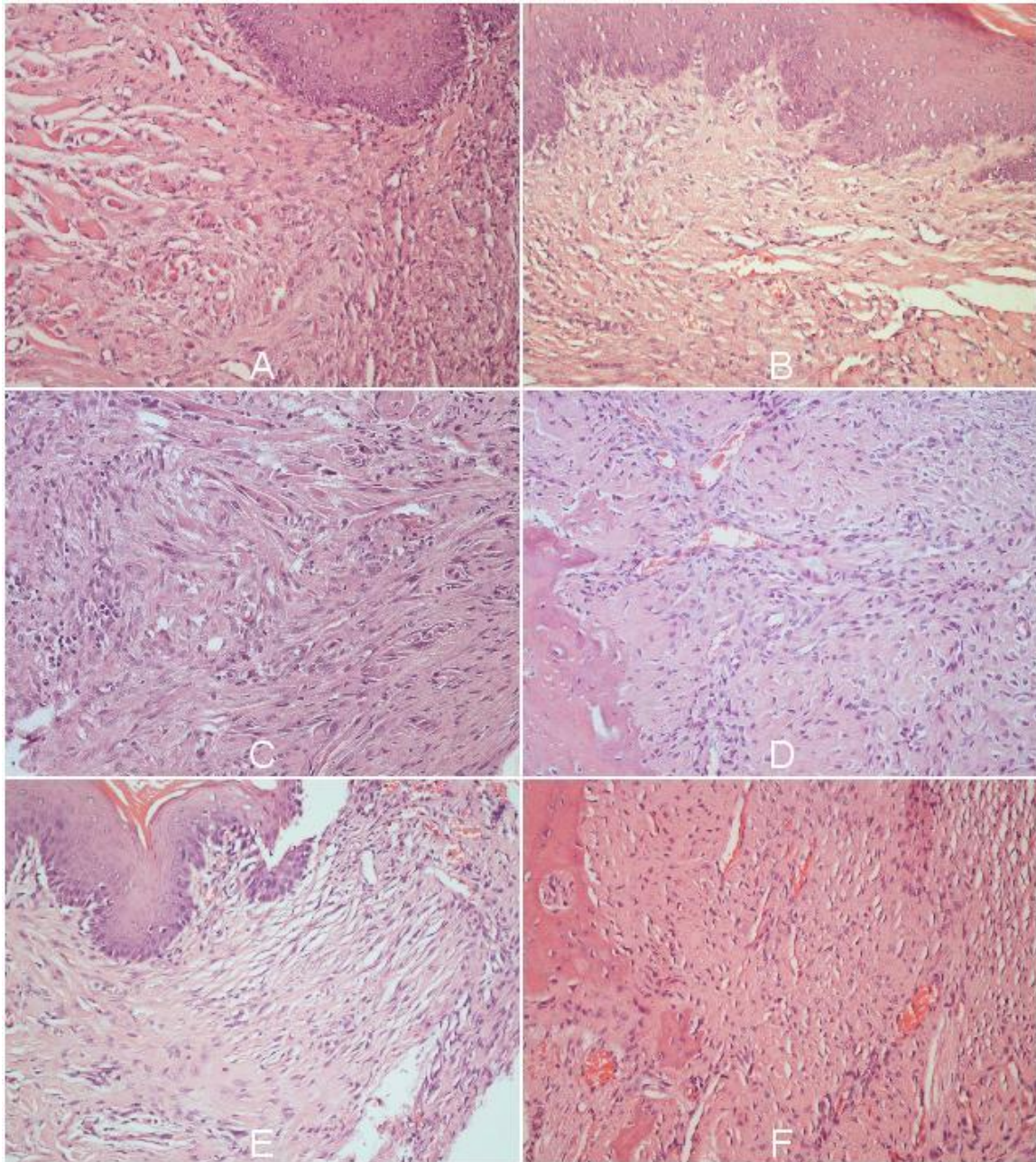
**Tabela 6.** Patohistološki skor fibroze ožiljnog tkiva određen za eksperimentalne grupe i kontrolnu grupu 21 dan posle ekstrakcije zuba pacova

Eksperimentalna grupa	K	NL	Q <sub>10</sub>	KU	NLQ <sub>10</sub>	NLKU
Skor fibroze	3	3	1,5	1,5	1	1

Periodontalno tkivo je dominantno prožeto fibrozim granulacionim tkivom, u različitim fazama sazrevanja (Grafikon 2, Tabela 6). Prisutni su snopovi kolagenih vlakana, između kojih se uočava prisustvo fibrocita, fibroblasta i makrofaga. Kolageni snopovi su veće debljine i zauzimaju organizovani raspored, pružajući se paralelno i blago talasasto (Slika 20). Celularnost je najveća u grupi K, dok je kod uzoraka iz grupa koje su tretirane antioksidansima prisutan manji broj interfascikularnih mezenhimnih i zapaljenskih ćelija, uz dominaciju usnopljenih vezivnotkivnih vlakana (Tabela 5, Grafikon 1). Fascikularni kolagen se boji dubokom (intenzivnom) plavom bojom na trihromnom bojenju (Slika 20), dok se Van Giesonovom histohemijskom tehnikom boji jasno crveno (Slika 21). Debljina i arhitekturna pravilnost u organizaciji kolagenih fascikula najizraženija je u grupi NLQ<sub>10</sub> (Slika 20F i 21F).

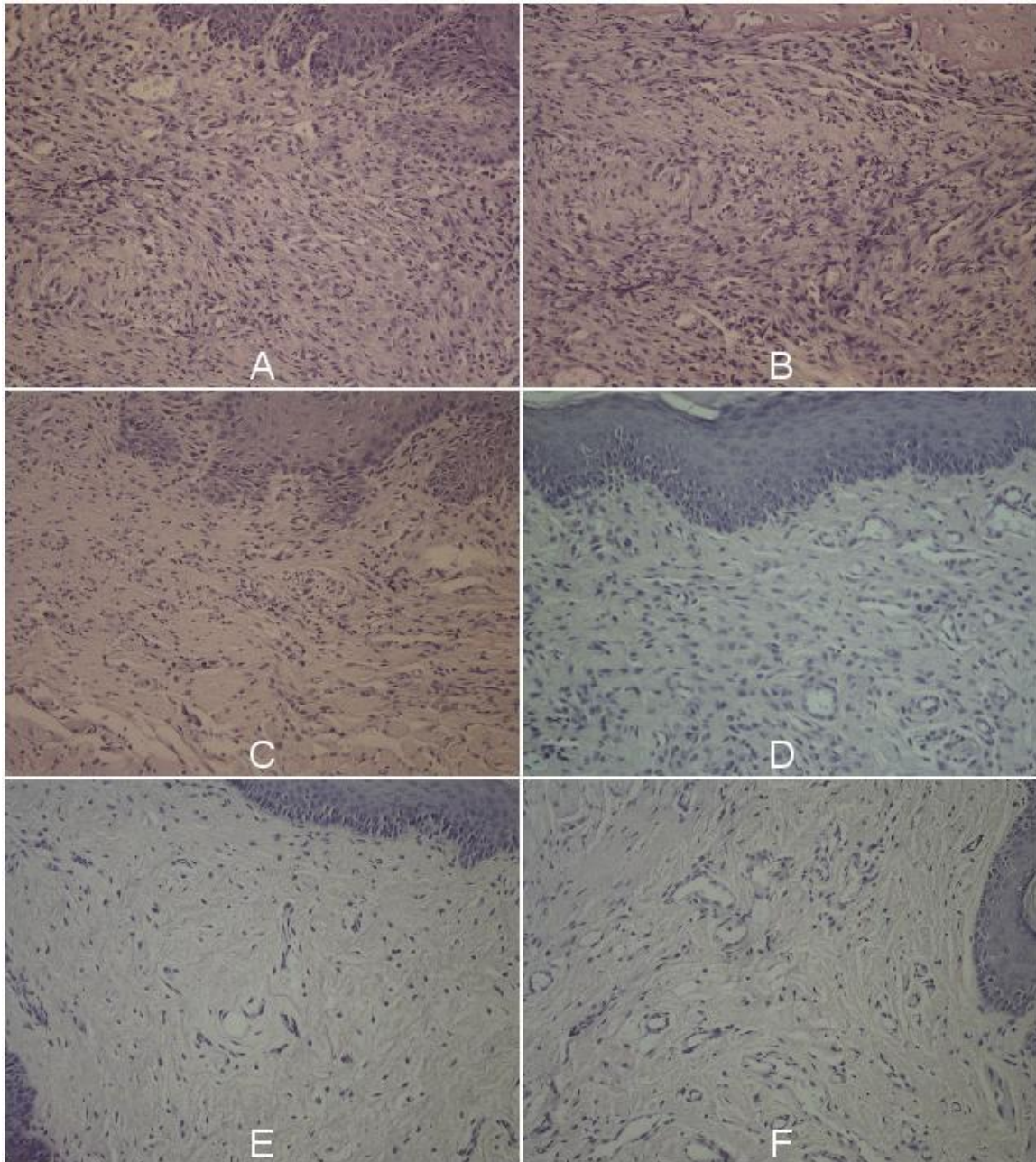
Sa progresijom reparacije, alveolarni defekt je u potpunosti organizovan zrelim granulacionim tkivom i slabo kalcifikovanim kostnim tkivom. U svim ispitivanim grupama mlade trabekule osteoidne kosti prožimaju defekt u celini, šireći se sa zidova alveolarnog sakusa. Zabeleženi su i znaci remodelovanja kortikalne kosti alveole, koja više nije građena od gustih i kompaktnih slojeva, već je dobila sunderast, trabekularan izgled.

Ekspresija osteopontina značajno je smanjena u svim ispitivanim grupama, najizraženije u grupama gde je primenjena antioksidantna zaštita i između njih nema izraženije razlike (Slika 22C-F). Aktivnost osteopontina prisutna je u izduženim vretenastim i retkim ovalnim ćelijama fibrozne strome u vidu veoma bledeg braonkastosmeđeg prebojavanja. U K i NL grupi još uvek se mogu naći subepitelne grupe ćelija sa srednje izraženim intenzitetom osteopontinskog bojenja (Slika 22A-B).

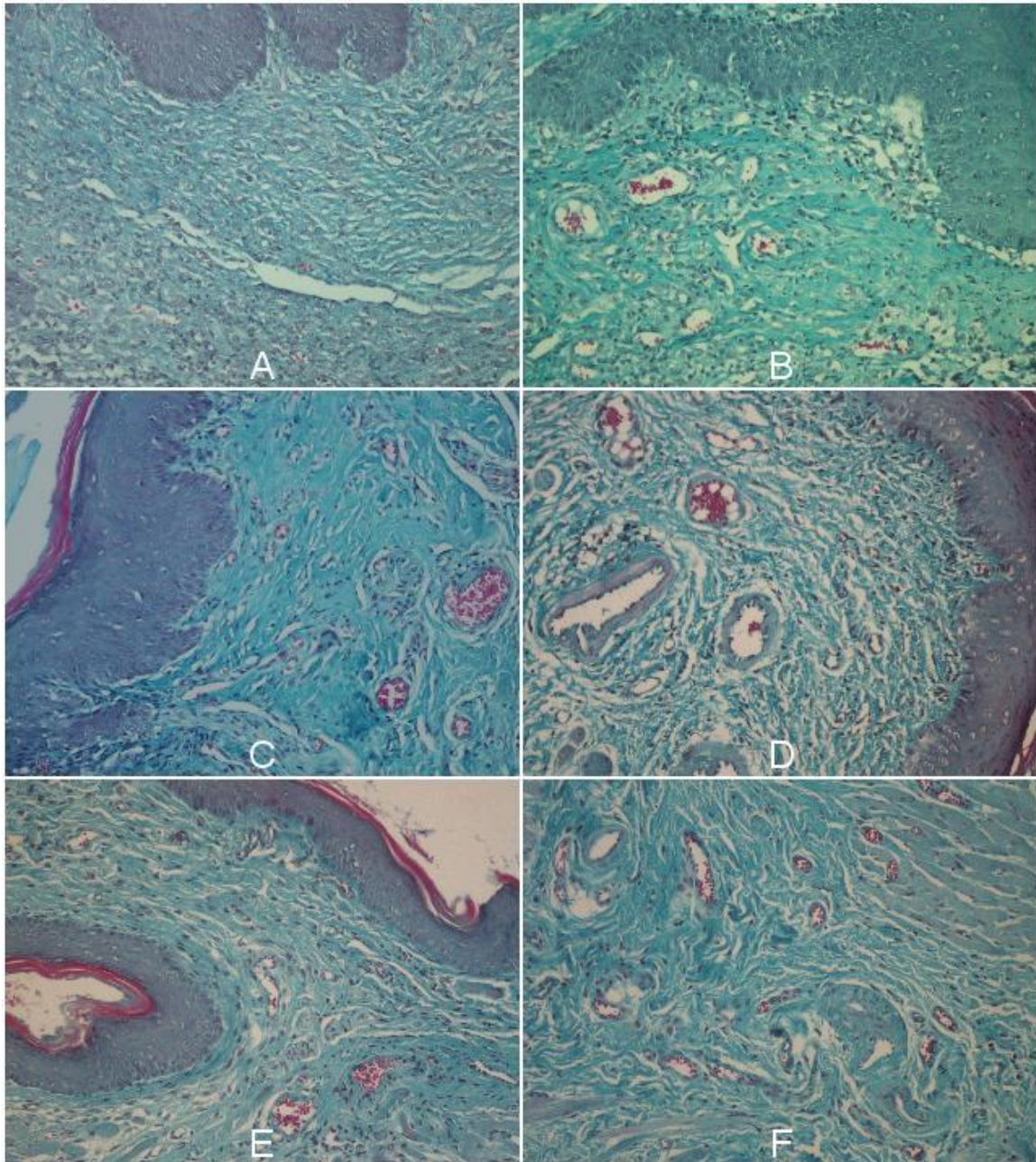


**Slika 18.** Histološki izgled procesa zarastanja mekih tkiva rane 21. dana posle ekstrakcije zuba: A - kontrolna grupa (K), B - prazni nanolipozomi (NL), C - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> (Q<sub>10</sub>), D - tretman kurkuminom (KU), E - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> enkapsuliranim u nanolipozome (NLQ<sub>10</sub>) i F - tretman kurkuminom enkapsuliranim u nanolipozome (NLKU). Hematoksilin-eozin bojenje, originalno uvećanje x200.

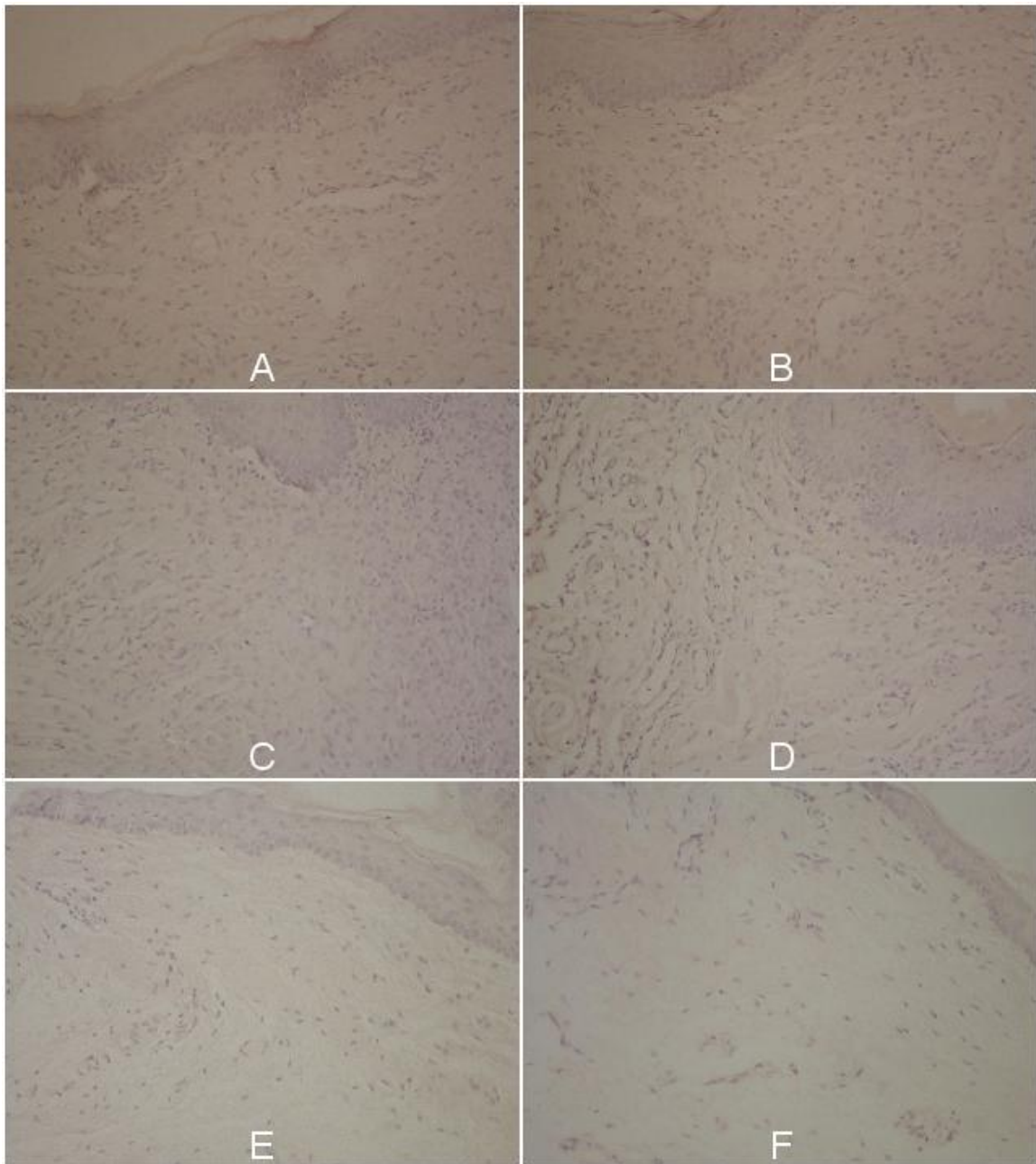




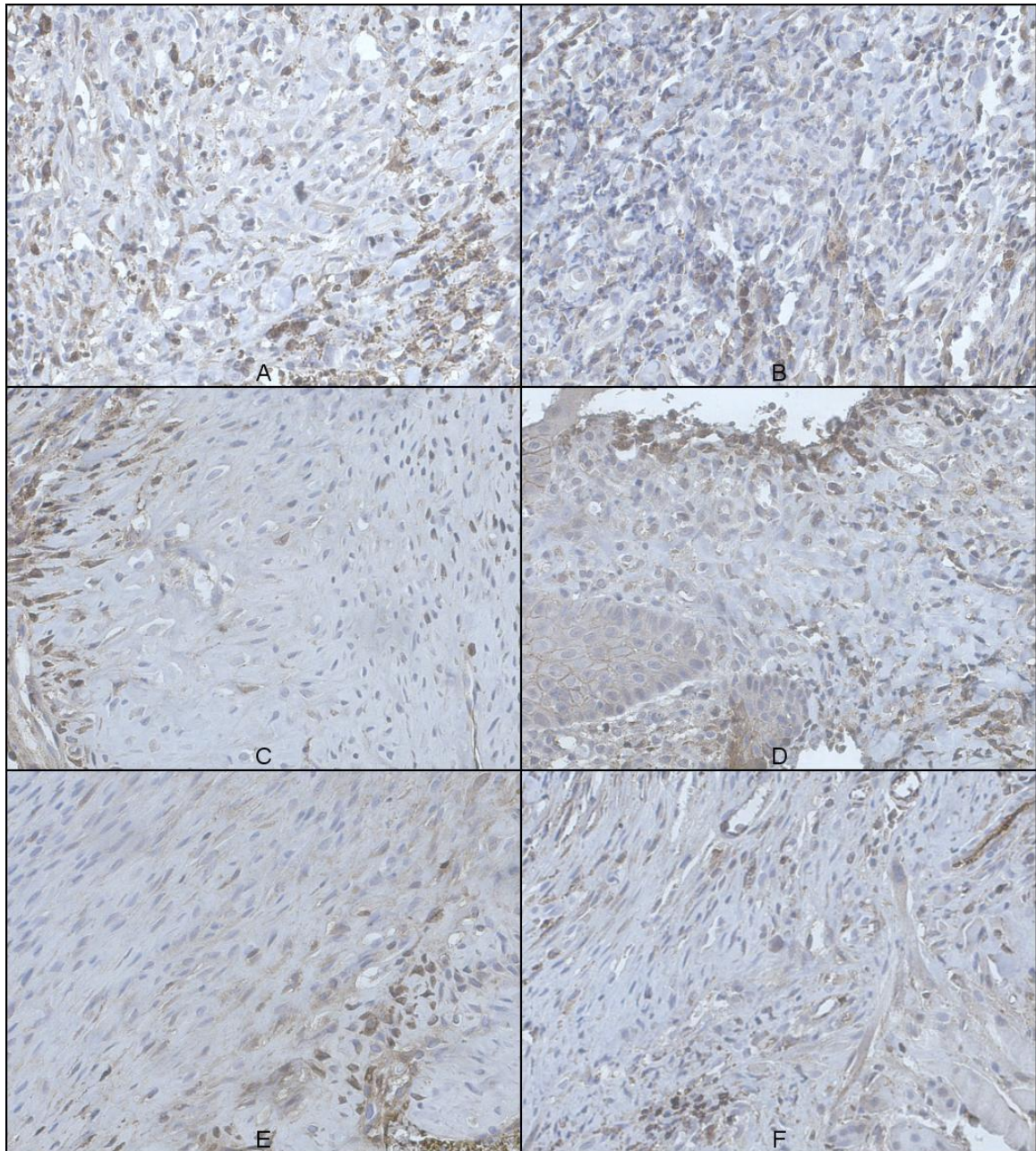
**Slika 19.** Zarastanje mekih tkiva rane 21. dana posle ekstrakcije zuba: A - kontrolna grupa (K), B - prazni nanolipozomi (NL), C - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> (Q<sub>10</sub>), D - tretman kurkuminom (KU), E - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> enkapsuliranim u nanolipozome (NLQ<sub>10</sub>) i F - tretman kurkuminom enkapsuliranim u nanolipozome (NLKU). AB-PAS histohemijsko bojenje, originalno uvećanje x200.



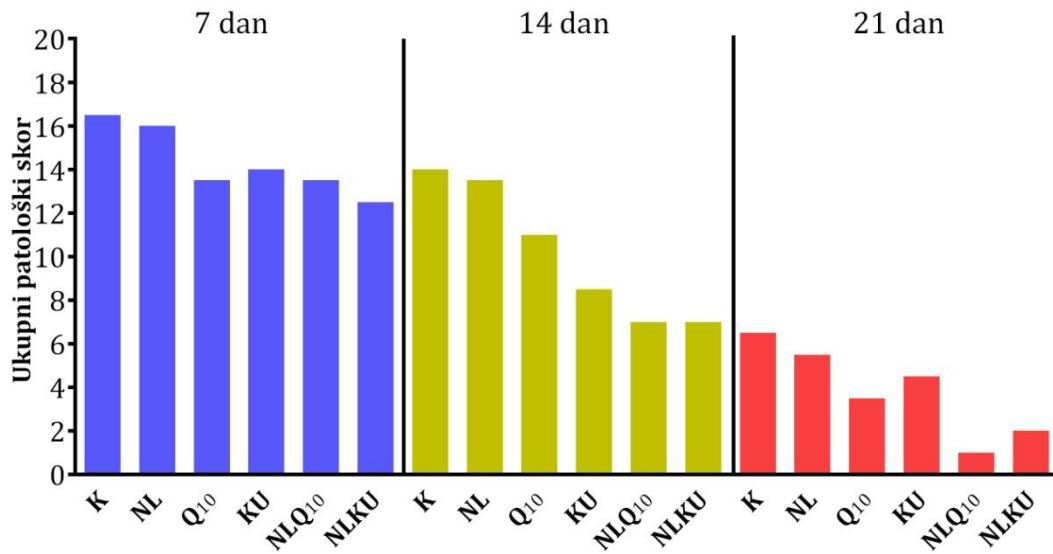
**Slika 20.** Zarastanje mekih tkiva postekstrakcione rane, 21. dana posle ekstrakcije zuba: A - kontrolna grupa (K), B - prazni nanolipozomi (NL), C - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> (Q<sub>10</sub>), D - tretman kurkuminom (KU), E - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> enkapsuliranim u nanolipozome (NLQ<sub>10</sub>) i F - tretman kurkuminom enkapsuliranim u nanolipozome (NLKU). Masson Trichrom histohemijsko bojenje, originalno uvećanje x200.



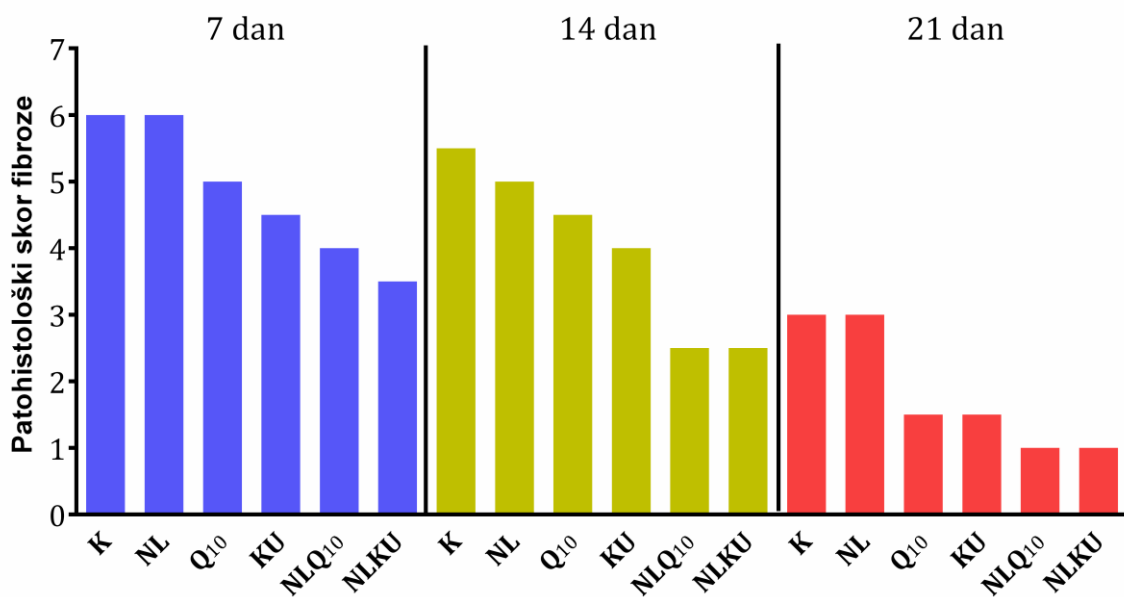
**Slika 21.** Zarastanje mekih tkiva rane 21. dana posle ekstrakcije zuba: A - kontrolna grupa (K), B - prazni nanolipozomi (NL), C - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> (Q<sub>10</sub>), D - tretman kurkuminom (KU), E - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> enkapsuliranim u nanolipozome (NLQ<sub>10</sub>) i F - tretman kurkuminom enkapsuliranim u nanolipozome (NLKU). Van Gieson histohemijsko bojenje, originalno uvećanje x200.



**Slika 22.** Imunohistohemijska ekspresija Osteopontina u zarastajućem mekom tkivu rane 21. dana posle ekstrakcije zuba: A - kontrolna grupa (K), B - prazni nanolipozomi (NL), C - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> (Q<sub>10</sub>), D - tretman kurkuminom (KU), E - tretman koenzimom Q<sub>10</sub> enkapsuliranim u nanolipozome (NLQ<sub>10</sub>) i F - tretman kurkuminom enkapsuliranim u nanolipozome (NLKU). Originalno uvećanje x400.



**Grafikon 1.** Ukupni patološki skor u tkivu koje okružuje ekstrakcionu ranu određen za eksperimentalne grupe i kontrolnu grupu 7, 14 i 21 dan posle ekstrakcije zuba pacova.

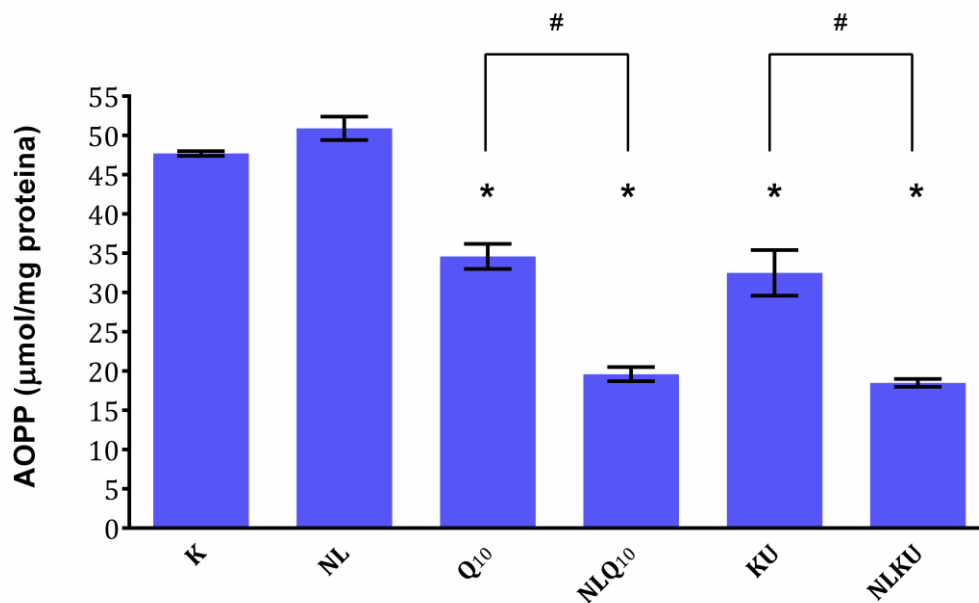


**Grafikon 2.** Patohistološki skor fibroze ožiljnog tkiva određen za eksperimentalne grupe i kontrolnu grupu 7, 14 i 21 dan posle ekstrakcije zuba pacova.

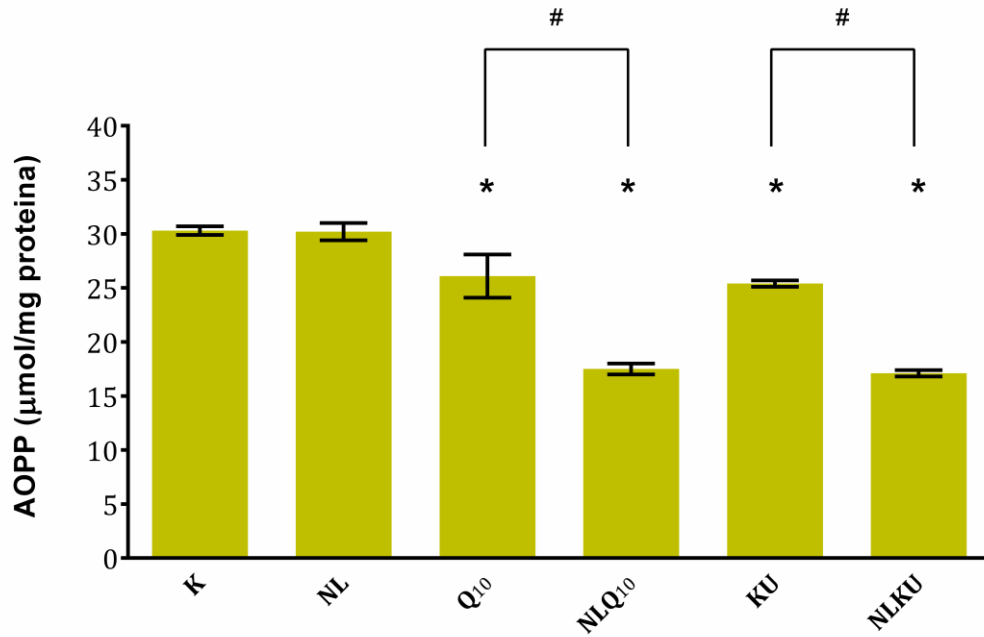
## 5.2. Rezultati analize markera oksidativnog stresa u homogenatu mekog tkiva koje okružuje postekstrakcionu ranu

### 5.2.1. Rezultati nivoa AOPP u homogenatu mekog tkiva koje okružuje ranu

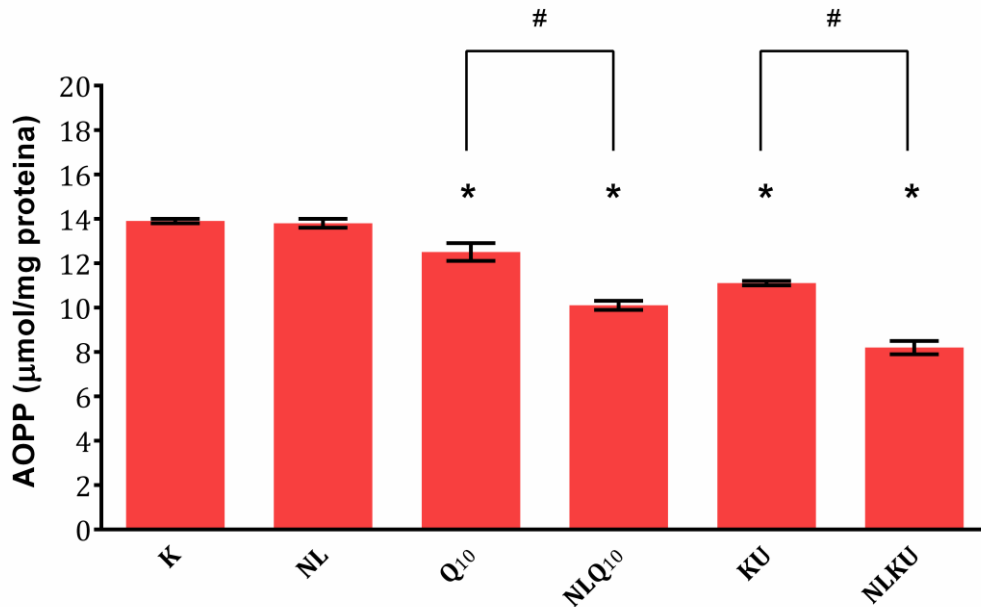
Srednje vrednosti AOPP u homogenatu mekog tkiva koje okružuje postekstrakcionu ranu dobijenog od životinja koje su tretirane CoQ<sub>10</sub> i KU, u slobodnoj i enkapsuliranoj formi, bile su statistički značajno smanjene u odnosu na vrednosti dobijene za kontrolnu grupu ( $p < 0,001$ ). Takođe, statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ) pronađena je između koncentracija AOPP-a u homogenatima mekog tkiva koje okružuje postekstrakcionu ranu životinja tretiranih sa Q<sub>10</sub> i NLQ<sub>10</sub>, kao i između onih tretiranih KU i NLKU (Grafikoni 3-5). Opisani trend aktivnosti ispitivanih jedinjenja dobijen je u uzorcima tkiva koji su uzeti 7., 14. i 21. dana posle ekstrakcije zuba (Grafikoni 3-5).



**Grafikon 3.** Srednje vrednosti koncentracija AOPP u homogenatima mekog tkiva koje okružuje postekstrakcionu ranu eksperimentalnih grupa i kontrolne grupe pacova 7 dana posle ekstrakcije zuba. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  SD ( $n=6$ ); \*ANOVA  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; # ANOVA  $p < 0,001$  između grupa koje su tretirane slobodnim i enkapsuliranim Q<sub>10</sub>, odnosno KU.



**Grafikon 4.** Srednje vrednosti koncentracija AOPP u homogenatima mekog tkiva koje okružuje postekstrakcionu ranu eksperimentalnih grupa i kontrolne grupe pacova 14 dana posle ekstrakcije zuba. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  SD (n=6); \* ANOVA  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; # ANOVA  $p < 0,001$  između grupa koje su tretirane slobodnim i enkapsuliranim Q<sub>10</sub>, odnosno KU.

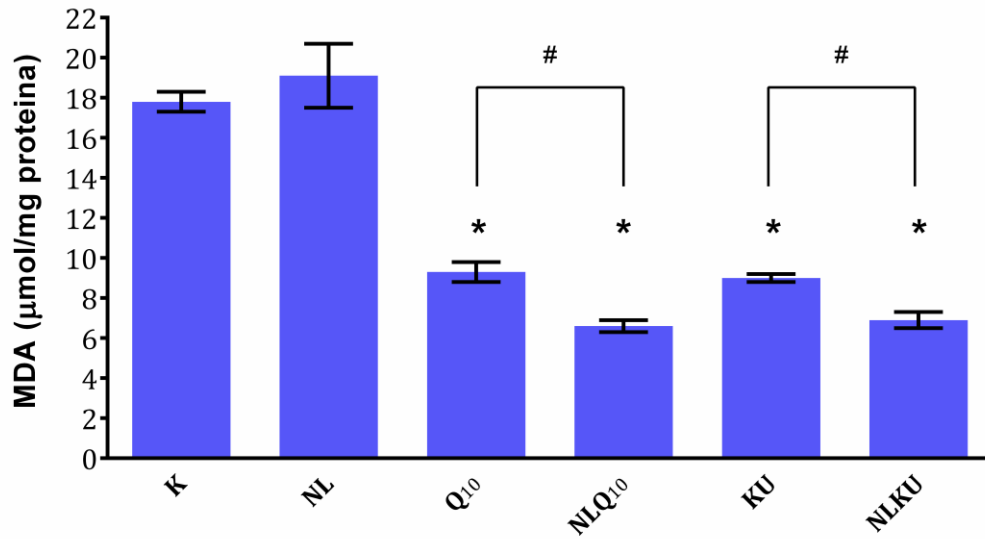


**Grafikon 5.** Srednje vrednosti koncentracija AOPP u homogenatima mekog tkiva koje okružuje postekstrakcionu ranu eksperimentalnih grupa i kontrolne grupe pacova 21 dan posle ekstrakcije zuba. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  SD (n=6); \* ANOVA  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; # ANOVA  $p < 0,001$  između grupa koje su tretirane slobodnim i enkapsuliranim Q<sub>10</sub>, odnosno KU.

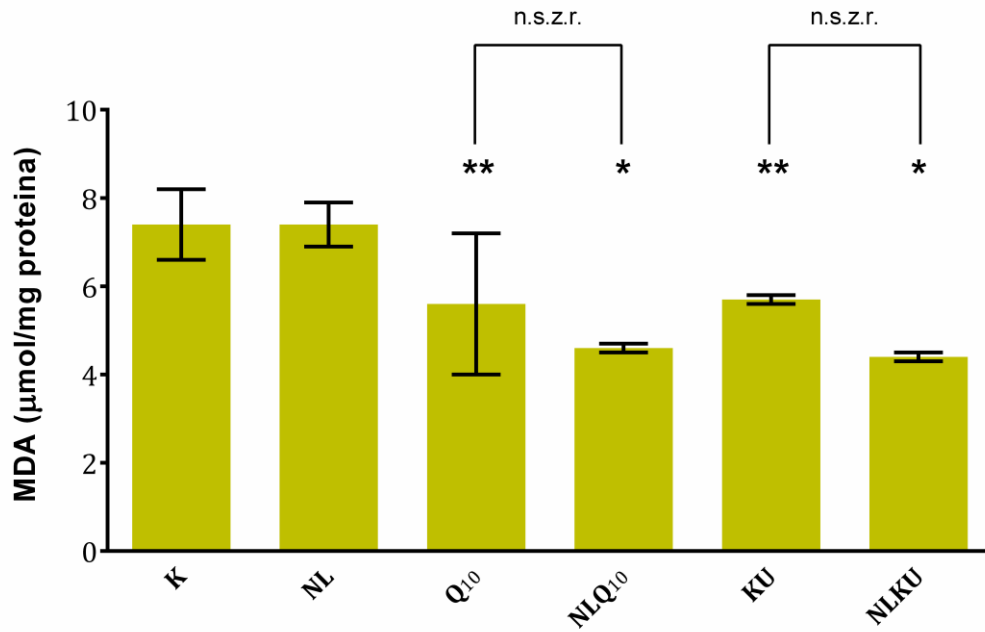
### 5.2.2. Rezultati nivoa MDA u homogenatu mekog tkiva koje okružuje ranu

Dobijene srednje vrednosti količine MDA u homogenatu mekog tkiva koje okružuje postekstrakcionu ranu dobijenog od životinja iz grupa Q<sub>10</sub>, NLQ<sub>10</sub>, KU i NLKU bile su statistički značajno manje u odnosu na vrednosti dobijene u K i NL grupi ( $p < 0,001$  i  $p < 0,01$ ). Ovakvo smanjenje količine MDA primećeno je u uzorcima koji su uzeti 7., 14. i 21. dana posle ekstrakcije zuba pacova (Grafikoni 6-8). Međusobnim upređivanjem dobijenih vrednosti MDA u homogenatima mekog tkiva koje okružuje postekstrakcionu ranu u Q<sub>10</sub> i NLQ<sub>10</sub>, kao i KU i NLKU grupama, pokazano je postojanje statistički značajne razlike ( $p < 0,001$ ) između vrednosti u ovim grupama 7. i 21. dana posle ekstrakcije zuba (Grafikoni 6 i 8).

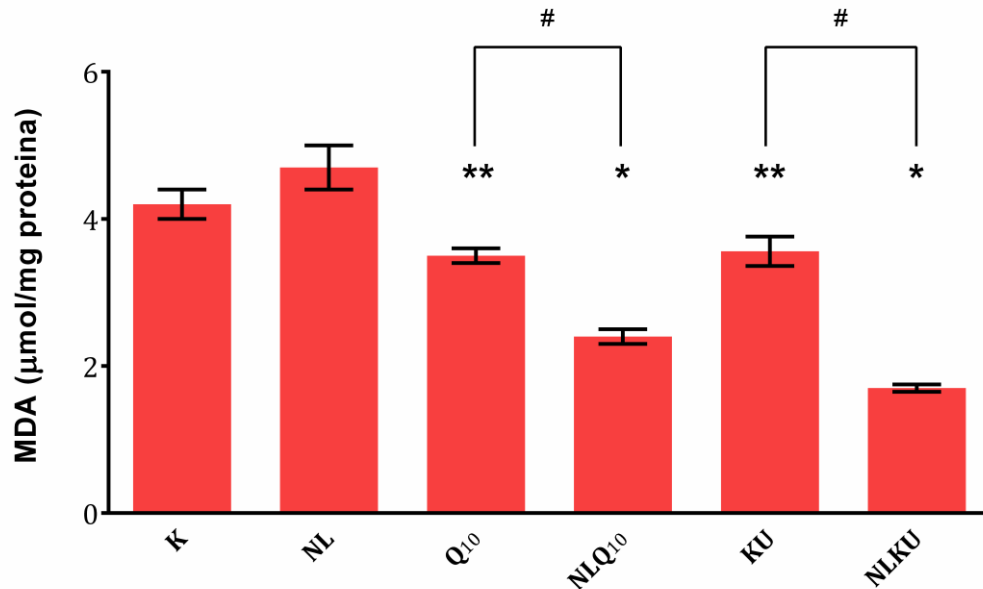




**Grafikon 6.** Srednje vrednosti koncentracija MDA u homogenatima mekog tkiva koje okružuje postekstrakcionu ranu eksperimentalnih grupa i kontrolne grupe pacova 7 dana posle ekstrakcije zuba. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  SD (n=6); \* ANOVA  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; # ANOVA  $p < 0,001$  između grupa koje su tretirane slobodnim i enkapsuliranim Q<sub>10</sub>, odnosno KU.



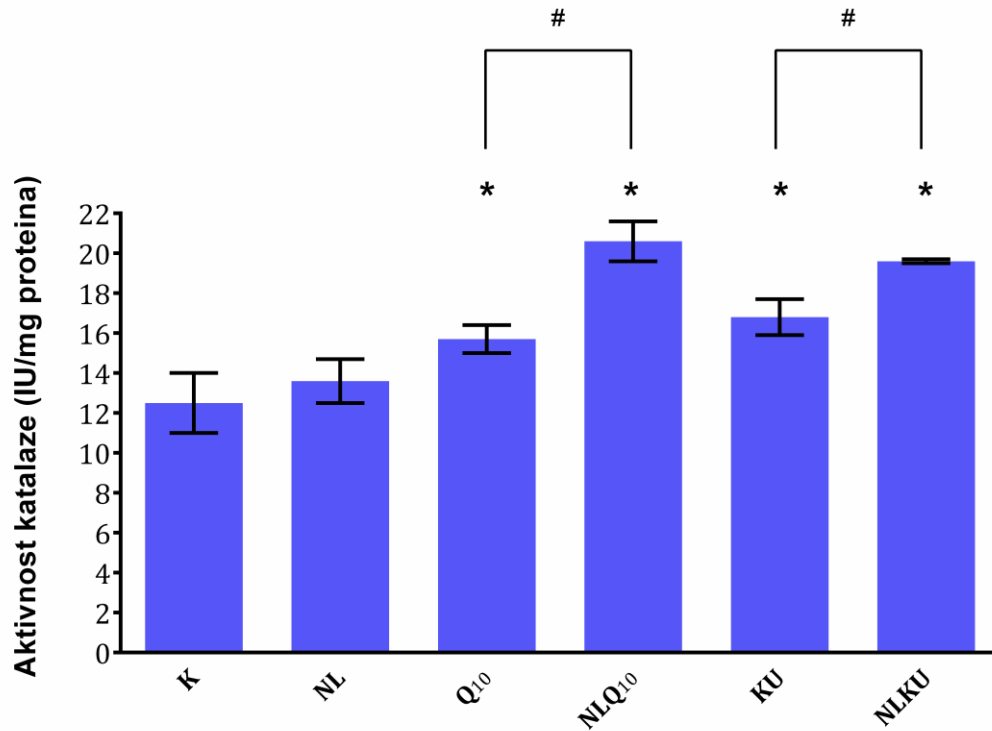
**Grafikon 7.** Srednje vrednosti koncentracija MDA u homogenatima mekog tkiva koje okružuje postekstrakcionu ranu eksperimentalnih grupa i kontrolne grupe pacova 14 dana posle ekstrakcije zuba. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  SD (n=6); \* ANOVA  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; \*\* ANOVA  $p < 0,01$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; n.s.z.r. – nema statistički značajne razlike između grupa.



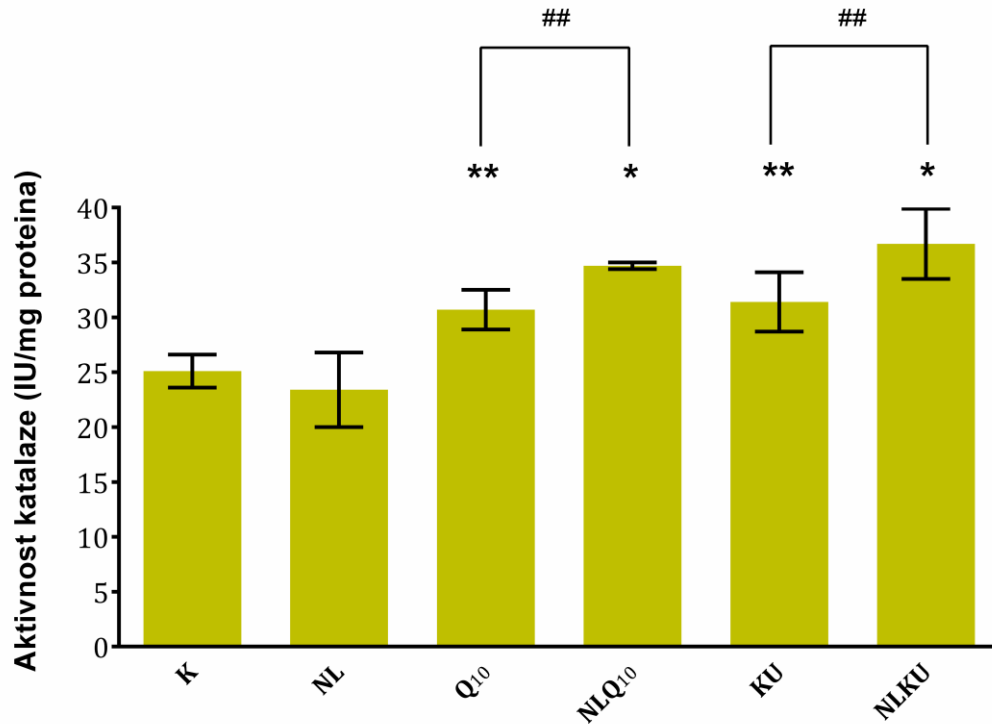
**Grafikon 8.** Srednje vrednosti koncentracija MDA u homogenatima mekog tkiva koje okružuje postekstrakcionu ranu eksperimentalnih grupa i kontrolne grupe pacova 21 dan posle ekstrakcije zuba. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  SD (n=6); \* ANOVA  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; \*\* ANOVA  $p < 0,01$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; # ANOVA  $p < 0,001$  između grupa koje su tretirane slobodnim i enkapsuliranim Q<sub>10</sub>, odnosno KU.

### 5.2.3. Rezultati aktivnosti CAT u homogenatu mekog tkiva koje okružuje ranu

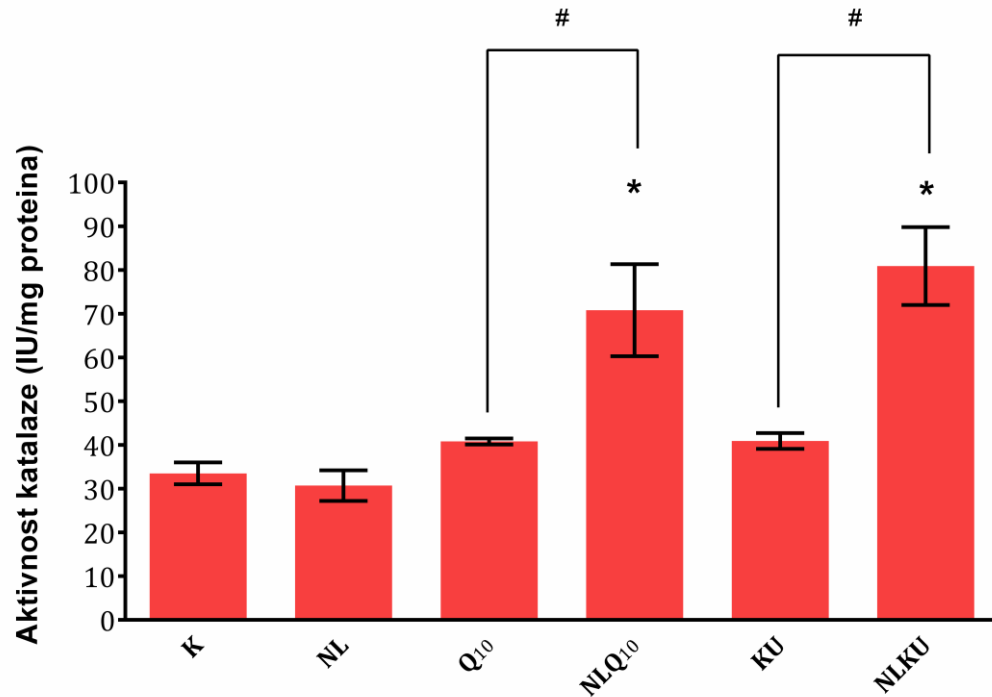
Srednje vrednosti aktivnosti katalaze u homogenatu mekog tkiva koje okružuje postekstrakcionu ranu dobijenog od životinja iz grupe Q<sub>10</sub>, NLQ<sub>10</sub>, KU i NLKU bile su statistički značajno veće u odnosu na vrednosti dobijene u K i NL grupama ( $p < 0,001$  i  $p < 0,01$ ). Ovako povećana aktivnost katalaze primećena je u uzorcima koji su uzeti 7. i 14. dana posle ekstrakcije zuba pacova (Grafikoni 9 i 10), dok se u uzorcima grupa Q<sub>10</sub> i KU, koji su uzeti 21 dan nakon ekstrakcije zuba, aktivnost katalaze nije statistički značajno razlikovala od K i NL grupa (Grafikon 11). Međusobnim upređivanjem dobijenih vrednosti aktivnosti katalaze u homogenatima mekog tkiva koje okružuje postekstrakcionu ranu u Q<sub>10</sub> i NLQ<sub>10</sub>, kao i KU i NLKU grupama, pokazano je postojanje statistički značajne razlike ( $p < 0,001$  i  $p < 0,01$ ) između vrednosti za ove grupe 7., 14. i 21. dana posle ekstrakcije zuba (Grafikoni 9-11).



**Grafikon 9.** Srednje vrednosti aktivnosti katalaze u homogenatima mekog tkiva koje okružuje postekstrakcionu ranu eksperimentalnih grupa i kontrolne grupe pacova 7 dana posle ekstrakcije zuba. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  SD (n=6); \* ANOVA  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; # ANOVA  $p < 0,001$  između grupa koje su tretirane slobodnim i enkapsuliranim Q<sub>10</sub>, odnosno KU.



**Grafikon 10.** Srednje vrednosti aktivnosti katalaze u homogenatima mekog tkiva koje okružuje postekstrakcionu ranu eksperimentalnih grupa i kontrolne grupe pacova 14 dana posle ekstrakcije zuba. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  SD (n=6); \* ANOVA  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; \*\* ANOVA  $p < 0,01$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; ## ANOVA  $p < 0,01$  između grupa koje su tretirane slobodnim i enkapsuliranim Q<sub>10</sub>, odnosno KU.



**Grafikon 11.** Srednje vrednosti aktivnosti katalaze u homogenatima mekog tkiva koje okružuje postekstrakcionu ranu eksperimentalnih grupa i kontrolne grupe pacova 21 dan posle ekstrakcije zuba. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  SD (n=6); \* ANOVA  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; # ANOVA  $p < 0,001$  između grupa koje su tretirane slobodnim i enkapsuliranim Q<sub>10</sub>, odnosno KU.

## 6. DISKUSIJA

Ovo eksperimentalno istraživanje predstavlja prvu studiju koja se bavi proučavanjem efekata lokalno aplikovanih rastvora koenzima Q<sub>10</sub> i kurkumina na proces zarastanja ekstrakcionih rana, kao i upoređivanjem efikasnosti pomenutih antioksidanasa u slobodnoj i enkapsuliranoj formi. Istraživanje je podstaknuto velikim brojem publikacija koje su dokazale da enkapsulacija različitih antioksidanasa u nanolipozome dovodi do povećanja bioaktivnosti i iskoristivosti aktivne supstance (Alves i sar., 2009; Marquez i sar. 2012; Kocić i sar., 2017). Brojne studije su pokazale pozitivne efekte CoQ<sub>10</sub> i KU na proces zarastanja rana (Mehrani i sar., 2015; Yoneda i sar., 2014; Mohanty i sar., 2012), ali nijedna se do sada nije bavila poređenjem efikasnosti njihove slobodne i enkapsulirane forme.

*In vivo* istraživanje je sprovedeno na animalnom modelu Wister pacova koji je omogućio imitiranje postupka ekstrakcije zuba i praćenje procesa zarastanja postekstrakcionih rana, prethodno lokalno tretiranih rastvorima antioksidanasa u slobodnoj formi i formi enkapsuliranoj u nanolipozome iz razloga što je struktura njihovog mekog i koštanog tkiva gornje vilice veoma slična sa istim strukturama kod čoveka. Kod pacova je bilo izvodljivo ekstrahirati maksilarne incizive, a mekotkivna i koštana destrukcija, kao i morbiditet rana, odgovarali su sličnim defektima koji prilikom ekstrakcije zuba nastaju kod ljudi. Studija je bazirana na praćenju inflamatorne, proliferativne i maturacione faze zarastanja rane posle ekstrakcije gornjih inciziva. Ovakav eksperimentalni metod odabran je iz razloga što se ubrzanje procesa zarastanja mekog tkiva, izazvano stimulativnim dejstvom specifičnih supstanci (antioksidanasa u slobodnoj i u formi enkapsuliranoj u nanolipozome) svakako reperkutuje i na poslednju fazu zarastanja rana, tj. koštanu regeneraciju.

Sličnosti u morfologiji lipozoma i ćelijskih membrana, kao i sposobnost inkorporacije brojnih supstanci unutar lipozomalnog omotača, čini ove molekule skoro savršenim sistemom za dopremanje aktivnih supstanci do ciljnih ćelija u organizmu. Enkapsulacija aktivne supstance u lipidni omotač lipozoma štiti supstancu od prevremene degradacije od strane enzimskog sistema, kao i od prevremene imunološke i hemijske inaktivacije. Na ovaj način lipozomi omogućavaju dopremanje supstance u

intaktnom stanju do željenog (ciljnog) tkiva, kao i izbegavanje kontakta zdravog tkiva sa lekom. Ovi efekti zajedno utiču na povećanje terapijskog indeksa aktivne supstance (Bozzuto i Molinari, 2015).

Postoji nekoliko načina interakcije lipozoma i ciljne ćelije prilikom dopremanja aktivne supstance i njene distribucije unutar ćelije (Bozzuto i Molinari, 2015). Lipozomi mogu biti apsorbirani u ćelijsku membranu unutar koje enzimi, poput lipaze, razgrađuju lipidni omotač nosioca, što dovodi do otpuštanja aktivne supstance u ECM, kao i njene difuzije kroz citoplazmu i membrane organela. Drugi način je fuzija lipozomalne membrane sa plazma membranom ciljne ćelije, pri čemu se direktno oslobađa sadržaj lipozoma u citoplazmu ćelije. Treći, i najčešći put interakcije lipozoma i ciljne ćelije je endocitoza posredovana receptorima (Bozzuto i Molinari, 2015). Ovaj put podrazumeva samo lipozome veličine do 150 nm i aktivne supstance otporne na kiselinu sredinu lizozoma, sa kojom lipozomi reaguju tokom procesa oslobađanja. Treba istaći da su lipozomi veličine preko 150 nm često fagocitovani od strane specijalizovanih ćelija imunog sistema, poput makrofaga, monocita i Kupferovih ćelija (Fanciullino i Ciccolini, 2009; Torchilin, 2011).

Nanolipozome odlikuju mnogobrojne povoljne karakteristike poput niske toksičnosti, velike stabilnosti, visoke biorasploživosti, stabilnog i kontinuiranog oslobađanja enkapsulirane supstance, kao i manje potrebne doze leka enkapsuliranog u nanolipozome (Mozafari, 2010). Značajno bolje efekte prilikom primene u formi nanolipozoma dali su i pojedini antioksidansi, poput KU i CoQ10.

Smatra se da KU zauzima trans-dvoslojnu orijentaciju u fosfolipidnoj membrani lipozoma, zahvaljujući jednoj fenoksil grupom smeštenoj bliže vezi između membrane i vode, dok su preostala fenoksil grupa i jedna keto-grupa smešene između hidrofobnog jezgra lipozoma (Barry i sar., 2009). Kurkumin primenjen u slobodnoj formi pokazuje izvesne nedostatke u stabilnosti, koji direktno utiču na smanjenje iskoristivosti i potencijalnih pozitivnih efekata ovog antioksidansa. Studija Sun i sar., koja je ispitala biorasploživost oralno primenjenog KU u slobodnoj formi i formi enkapsuliranoj u nanolipozome, pokazala je vrednost biorasploživosti od čak 448% u grupi životinja gde je KU primenjen u enkapsuliranoj u odnosu na slobodnu formu (Sun i sar., 2014). Enkapulacijom KU u nanolipozome prevazilazi se problem slabe stabilnosti KU u



oralnoj sredini, slabe apsorpcije kao i njegova brza razgradnja, dok se sa druge strane poboljšava njegova rastvorljivost u vodi i termostabilnost (Hasan i sar., 2014).

Na stabilnost KU značajno utiče pH vrednost sredine. Kurkumin je stabilniji pri nižim pH vrednostima, odnosno pokazuje veću otpornost prema hidrolizi u kiseloj sredini u odnosu na baznu (Chen i sar., 2015). Nakon enkapsulacije KU u nanoliposome, značajno se povećava njegova stabilnost pri promeni pH vrednosti sredine (Chen i sar., 2015). Međutim, pH vrednost 12 degradira fosfolipidni omotač nanolipozoma i dolazi do oslobađanja i hidrolize KU (Feng i sar., 2017). S obzirom da je pH pljuvačke pacova Wistar soja  $7,12 \pm 0,02$  (Pirani i sar., 1987), enkapsulacija KU u nanoliposome u našem eksperimentalnom istraživanju omogućila je njegovu maksimalnu stabilnost i iskoristivost u procesu zarastanja ekstrakcione rane.

Sama veličina molekula CoQ<sub>10</sub> i njegova termolabilnost pokazali su se kao glavni nedostaci prilikom lokalne primene ovog antioksidansa (Borekova i sar., 2008). Lee i Tsai navode da lipozomalni rastvor CoQ<sub>10</sub> poboljšava prodiranje istoimenog antioksidansa kroz kožu, ali i da je istovremeno prilikom primene većih koncentracija aktivne supstance njena akumulacija na mestu aplikacije bila veća, a u skladu sa adekvatnom dužinom tretmana koja je bila neophodna za postizanje maksimalnih koncentracija. Tako, nakon 4 h od tretmana lipozomalnim rastvorom CoQ<sub>10</sub>, ukupna količina CoQ<sub>10</sub> u koži bila je značajno veća u odnosu na vrednosti posle 1 h od primene (Lee i Tsai., 2010).

Rezultati histopatoloških i imunohistohemijskih analiza, kao i analiza nivoa oksidativnog stresa, pokazuju da se CoQ<sub>10</sub> i KU enkapsuliranim u nanoliposome može značajno uticati na skraćenje vremena zarastanja ekstrakcionih rana usne duplje. Zarastanje ekstrakcionih rana prolazi kroz niz strogo kontrolisanih, međusobno povezanih faza, koje je hronološki teško jasno definisati i ograničiti. Neposredno nakon same intervencije, razvija se inflamatorna reakcija pod dejstvom proinflamatornih citokina koji bivaju sintetisani i sekretovani od strane aktiviranih makrofaga, limfocita i endotelijalnih ćelija (Pober i Sessa, 2007). Nekonrolisana inflamacija može dovesti do razvoja neželjenih efekata sa oštećenjem tkiva. Ovu fazu karakteriše uklanjanje nastalog debrisa, početak proliferacije i razvoj granulacionog tkiva (Goldsmith, 1991). Prisutni neutrofilni oslobađaju čitav arsenal proteolitičkih enzima koji razlažu i eliminišu

elemente oštećenog tkiva, slobodne radikale i brojne medijatore inflamacije kao što je azot oksid. Fagocitnom aktivnošću zapaljenskih ćelija uklanja se nekrotični ćelijski debrisi i koagulum koji u potpunosti ispunjava alveolarni sakus. Ukoliko se inflamatorna faza produži, posledično će se usporiti nastanak granulacionog tkiva, a može doći i do nezatvaranja rane (Kant i sar., 2014). Jedan od veoma važnih enzima koji je uključen u proces zapaljenja i remodelovanja tkiva je MMP-9, a luče ga infamatorne ćelije tipa neutrofila i makrofaga (Kant i sar., 2014).

Lokalna primena antioksidanasa, u našoj eksperimentalnoj studiji na ranu nastalu nakon ekstrakcije zuba, dala je značajne rezultate, verovatno inhibicijom medijatora zapaljenja i slobodnih radikala nastalih oksidativnim stresom. Kurkumin inhibira produkciju TNF- $\alpha$  i IL-1, dva glavna proinflamatorna citokina koji su odgovorni za regulaciju inflamacije (Mehrani i sar., 2015). Kod miševa sa dijabetesom utvrđeno je da KU smanjuje ekspresiju inflamatornih citokina/enzima TNF- $\alpha$ , IL-1 i MMP-9, a sa druge strane povećava nivoe antiinflamatornih citokina (IL-10) i enzima (SOD, CAT i glutation peroksidaza) u tkivu rane (Kant i sar., 2014). U različitim modelima inflamacije pokazano je da KU ima sposobnost inhibicije produkcije azot oksida koji predstavlja jedan od važnih medijatora u procesu inflamacije (Akbik i sar., 2014). Od jednake važnosti je i sposobnost KU da blokira aktivnost NF-( $\kappa$ )B, transkripcionog faktora koji reguliše aktivnost većine gena odgovornih za inicijaciju inflamacije (Akbik i sar., 2014). Pored ovoga, NF-( $\kappa$ )B se smatra odgovornim i za korelaciju između oksidacije i inflamacije u procesu zarastanja rana (Mohanty i sar., 2012). Ove tvrdnje odgovaraju i rezultatima ove studije, koja je pokazala da grupa životinja tretirana rastvorom KU, pokazuje manji stepen inflamacije u odnosu na kontrolnu grupu, ali i da ne postoji značajna razlika između grupa životinja tretiranih rastvorom kurkumina u slobodnoj i enkapsuliranoj formi. S druge strane prilikom analize histoloških preseka obojeni anti-osteopontinskim antitelom primećuje se značajna inhibicija ekspresije ovog proteina u grupama životinja tretiranih KU i NLKU (Slika 12) već posle 7 dana od ekstrakcije zuba. Ovakav nalaz je donekle i očekivan s obzirom da je prethodno pokazano da sam KU (ili u kombinaciji) pospešuje zarastanje rana koje su indukovane laserom ili radiacijom. Takođe KU pospešuje zarastanje rana kod životinja kojima je aplikovan deksametazom ili neki drugi kortikosteroid koji dovodi do poremećaja zarastanja rana (Kant i sar., 2014).

Slične rezultate dala je i lokalna aplikacija rastvora CoQ<sub>10</sub>, gde je kod svih životinja uočen manje izražen zapaljenski infiltrat, a najmanje izražen bio je u grupi kojoj je aplikovan CoQ<sub>10</sub> enkapsuliran u nanoliposome. Redukcija inflamatornog procesa i povećana depoziciju kolagena nakon ekstrakcije zuba na modelu pacova, gde je CoQ<sub>10</sub> lokalno aplikovan u obliku masti pokazano je u istraživanju Yoneda i sar. (2014). Takođe, pokazano je da je ekspresija IL-1, TNF- $\alpha$ , NF( $\kappa$ )-B i HO-1, citokina inflamacije i hipoksičnog oštećenja tkiva, bila značajno smanjena u mekom tkivu koje okružuje ranu kod životinja tretiranih CoQ<sub>10</sub>, doprinoseći teoriji da smanjenje inflamacije doprinosi bržem zarastanju rana (Akbik i sar., 2014; Yoneda i sar., 2014).

Jedan od važnih proteinskih komponenti ekstracelularnog matriksa (ECM) i proinflamatornih molekula koji ima sposobnost hemotaksije (privlačenje neutrofila, makrofaga i Langerhansovih ćelija) je osteopontin. Ovaj molekul takođe utiče na zarastanje rane, biomineralizaciju, imuni odgovor i tumorogenezu (Chimento i sar., 2017). Osteopontin je glikoprotein sa velikim brojem funkcionalnih domena preko kojih se može vezati za integrinske receptore i CD44. Aktivacijom ovih receptora osteopontin aktivira kaskadu intracelularnih puteva dovodeći do interakcije ćelija sa ECM i drugim ćelijama (Denhardt i sar., 2001). Veliki broj ćelija, kao što su aktivirane imunske ćelije (T limfociti, NK ćelije, makrofagi), fibroblasti, osteoblasti, osteociti, ćelije kosne srži i endotelne ćelije, ekspimiraju osteopontin (Chimento i sar., 2017). Osteopontin se može naći kao sastavni deo ECM u mineralizovanim tkivima, ali i kao slobodan citokin u cirkulišućim tečnostima (Denhardt i sar., 2001). Jedna od njegovih uloga kao cirkulišućeg citokina je hemotaksija makforaga na mesto inflamacije, povećanje senzitivnosti makforaga na dejstvo drugih hemotaksičnih molekula i bolja adherencija cirkulišućih T limfocita i monocita (makrofaga). Takođe u makrofagima direktno utiče na ekspresiju MMP omogućavajući ovim ćelijama lakše i bolje kretanje kroz ECM (Denhardt i sar., 2001).

Važno je istaći da u toku inflamatorne faze osteopontin ekspimiraju ćelije kao što su neutrofil, makrofagi, mastociti i bazofili koje čine inflamatorni infiltrat. Aktivnošću ovih ćelija aktiviraju se i diferencijaciju fibroblasti i miofibroblasti, koji učestvuju u daljoj depoziciji ECM i kolagena (Chimento i sar., 2017). Aktivnost tj. ekspresija osteopontina zavisi i od proinflamatornih citokina kao što su IL-1 i TNF- $\alpha$  koje sekretuju inflamatorne ćelije. Ovako sekretovani citokini direktno povećavaju

transkripciju osteopontina u fibroblastima tokom proliferativne faze zarastanja rane (Chimento i sar., 2017). Različite studije utvrdile su da se osteopontin eksprimira u tkivu rane već nakon 6 sati od nastanka rane. Kod miševa kod kojih nedostaje gen za sintezu osteopontina (knock-out životinje) zarastanje rane je značajno kompromitovano (Denhardt i sar., 2001). U ranama ima veoma malo debrisa, ECM je dezorganizovan, a kolagena vlakna su manjeg dijametra u poređenju sa onim kod kontrolnih miševa (Denhardt i sar., 2001). Veliku ulogu osteopontina u procesu zarastanja rane kod miševa pokazali su i Mori i sar., (2008). Aplikacijom antisense oligodeoksinukleotida (injekcijom), koji dovodi do inhibicije translacije mRNK i posledično do inhibicije stvaranja osteopontina, pospešuje se zarastanje rane i smanjuje se obim granulacionog i ožiljnog tkiva. Rezultati dobijeni kod životinja tretiranih slobodnim i enkapsulisanim antioksidansima ukazuju na značajnu redukciji ovog proinflamatornog markera u mekom tkivu koje okuržuje postekstrakcionu ranu.

Proliferativnu fazu zarastanja odlikuje formiranje granulacionog tkiva i depozicija kolagena (formiranje ECM), proliferacija fibroblasta, epitelizacija i apoptoza štetnih ćelija (de Abreu i sar., 2013). Granulaciono tkivo ispunjava defekte stvorene kolikvacijom ćelijskog detritusa i zamenjuje nekrotični materijal koji je nastao direktnim mehaničkim oštećenjem periodontalnih mekih tkiva u toku ekstrakcije, kao i destrukcijom prouzrokovanom inicijalnom zapaljenskom reakcijom. Već od trećeg postoperativnog dana u mekom tkivu se povećava broj makrofaga i fibroblasta, dok se broj neutrofila smanjuje (Sultana i sar., 2009). Fazu urastanja granulacionog tkiva karakterišu dva osnovna procesa: angiogeneza i fibrogeneza. Intenzivan proces angiogeneze (neovaskularizacije), sa pupljenjem postojećih krvnih sudova i proliferacijom endotelnih ćelija sa margina oštećenih krvnih sudova, evidentan je krajem prve nedelje procesa reparacije (Sultana i sar., 2009). Ova faza procesa zarastanja rane značajno zavisi od velikog broja kontrolisanih procesa gde MMPe igraju veoma važnu ulogu. Ovi enzimi uklanjaju inicijalno debris u rani, a u kasnijim fazama kontrolišu angiogenezu, epitelizaciju i remodelovanje ožiljnog tkiva (Kant i sar., 2014). Ekspresija MMPa u normalnom tkivu rane je kompleksna i njihova koncentracija varira u zavisnosti od faze zarastanja u kojoj se rana nalazi. Takođe, pokazano je da poremećaj u sintezi i/ili odnosu MMPa i njihovih inhibitora dovodi do poremećaja procesa zarastanja rane i disorganizacije ECM (Kant i sar., 2014)

Za formiranje granulacionog tkiva, produkciju kolagena i remodelaciju tkiva, presudna je infiltracija fibroblasta na mestu povrede (Sultana i sar., 2009). Kolagen je prirodni supstrat koji omogućava vezu između ćelija i ECM, stimuliše ćelijski rast, proliferaciju i diferencijaciju (Choi i sar. 2009). Pojedina istraživanja pokazala su da nedostatak proliferacije i migracije fibroblasta na mesto povrede dovodi do otežanog i /ili odloženog zarastanja rana na koži (Blakytyn i Jude, 2006). Formiranje kolagena od strane fibroblasta je TGF, ali i TNF- $\alpha$  zavisno, gde je nakon aplikacije TNF- $\alpha$  dolazi ne samo do smanjenja sinteze kolagena već i do smanjene kontrakcione snage rane (Goldberg i sar., 2007). Pored toga TNF- $\alpha$  inhibira fosforilaciju različitih signalnih molekula koji posledično dovode do smanjene transkripcije TGF, kolagena 1A, fibronektina i aktina (Goldberg i sar., 2007). S obzirom da je pokazano da KU utiče na ekspresiju TNF- $\alpha$  može se očekivati da ovakvi efekti izostanu, tj da se količina kolagena u rani životinja tretiranih KU nije smanjila. Stimulativni efekat KU na migraciju i proliferaciju fibroblasta, kao i na njihovu diferencijaciju u miofibroblaste dokazan je u mnogim *in vivo* studijama (Akbik i sar., 2014, Mohanty i sar., 2012., Flora i sar. 2013). Kombinovana primena lasera male snage i lokalno aplikovanog rastvora CoQ<sub>10</sub> na proces zarstaja rana na koži miševa, dovela je do povećanja ćelijske proliferacije na 24%, što je bilo čak 300% više u odnosu na kontrolnu grupu (Mao i sar., 2015). Slično, indukcija proliferacije od strane oba antioksidansa primećena je i u našoj studiji, gde je kod tretiranih životinja osteopontinska ekspresija bila prisutna u većini mezenhimskih ćelija koje proliferišu sa ivica defekta. Pored precizne imunohistohemijske reakcije i na tkivnim isečcima bojenim HE kod životinja tretiranih antioksidansima, u slobodnoj i enkapsuliranoj formi, fokalno se primećuju mitoze u fibroblastima i u manjem broju fibrocita, čija su jedra vretenasta i tamna. Takođe, na mikroskopskim preparatima uzoraka dobijenih iz NLQ<sub>10</sub> i NLKU grupa, primećeno je prisustvo mešavine fibrovaskularnog i zrelog fibroznog granulacionog tkiva, sa jasno definisanim krvnim sudovima već nakon samo 7 dana od aplikacije enkapsuliranim antioksidansima.

Međutim, suprotno ovim rezultatima, u *in vitro* studiji nije došlo do stimulacije migracije fibroblasta po uticajem KU (Topman i sar., 2013). Ovakav rezultat se objašnjava kompleksnim procesom zarastanja rane u *in vivo* uslovima, jer se u *in vitro* uslovima procenjuje samo direktan efekat na jednu ćelijsku populaciju, ali ne i na čitav složen proces koji se sreće u *in vivo* uslovima (Topman i sar., 2013). Značajno je napomenuti da je u *in vitro* studijama dokazano i toksično delovanje KU, odnosno da

je pri dozama od 25  $\mu\text{M}$  dolazilo do apoptoze fibroblasta. Pri ovoj koncentraciji KU je povećao koncentraciju ROS, koji se smatraju primarnim uzrokom apoptoze fibroblasta (Topman i sar., 2013). Niže koncentracije KU (5-10  $\mu\text{M}$ ) nisu dale citotoksičan efekat, niti su dovele do bilo kakve promene u morfologiji fibroblasta (Scharstuhl i sar., 2009). Značajno bolji rezultati efekta KU, u smislu povećane bioaktivnosti i iskoristivosti, dobijeni su u studijama gde je ovaj antioksidans korišćen u formi nanolipozoma (Anand i sar., 2010).

Choi i saradnici (2009) navode da CoQ<sub>10</sub> stimulatивно deluje na povećanje broja fibroblasta i sinteze kolagena u oštećenim tkivima, i time značajno doprinosi uspešnijem zarastanju rana kod povređenih tkiva. Tri dana posle ekstrakcije zuba i lokalne aplikacije CoQ<sub>10</sub> primećena je značajna razlika u intenzitetu inflamacije i stepenu depozicije kolagena koja se nalazi na površini rane, dok se u dubljim slojevima nije primećivala razlika između tretiranih životinja i kontrolne grupe (Yoneda i sar., 2014). Smatra se da je lokalna aplikacija CoQ<sub>10</sub> razlog za postojanje diskrepance u patohistološkom nalazu površnih i dubokih slojeva nakon tretmana, i zaključeno je da bi injekcija CoQ<sub>10</sub> pospešila ove procese i u dubljim slojevima postekstrakcione rane. Yoneda i saradnici su došli do sličnog zaključka, navodeći da lokalno aplikovana redukovana forma CoQ<sub>10</sub> prouzrokuje povećanje produkcije FGF-2, povećanje ekspresije gena MMP-3 i smanjenje ekspresije TIMP-1, koji igraju ključnu ulogu u remodelovanju ECM, odnosno dovodi do povećanja gustine kolagenih vlakana u ECM utičući na procese remodelovanja ECM (Yoneda i sar., 2014). Jagetia i Rajanikant (2012) u svojoj studiji navode da je najveća sinteza kolagena kod eksperimentalnog modela pacova bila postignuta nakon osam dana tretmana KU. Takođe, studija Mao i sar. (2009) pokazala je 50% veću koncentraciju hidrokisprolina, amino kiseline koja se koristi kao indikator za merenje količine kolagena, u grupi životinja tretiranih lokalno laserom male snage i CoQ<sub>10</sub>, u odnosu na kontrolnu grupu.

Rezultati ove studije pokazali su takođe raniju depoziciju kolagena i intenzivniju maturaciju struktura vezinog tkiva kod većine eksperimentalnih životinja tretiranih rastvorom CoQ<sub>10</sub> i KU. Treba istaći da su značajno bolji rezultati bili u grupama gde su istoimeni antioksidansi bili enkapsulirani u nanolipozome. Nađeno je da kod NLQ<sub>10</sub> grupe životinja tretiranih tokom 21-og dana, patohistološki uzorci bojani tehnikom po Massonu i Van Giesonu, pokazuju najznačajniju debljinu i arhitekturnu

pravilnost u organizaciji kolagenih fascikula. Takođe, eksperimentalne životinje tretirane antioksidansima pokazale su nešto manji obim granulacionog tkiva u poređenju sa kontrolnom grupom i veći stepen fibroze.

Brojna istraživanja dokazala su i pozitivan efekat KU na kontrakciju rane, koja predstavlja jednu od završnih faza u procesu zarastanja. Durgaprasad i sar. (2011) navodi čak 20% veću kontrakciju rane i redukciju veličine defekta kod lokalne aplikacije kurkumina, dok rezultati Dai i sar. (2009) pokazuju da lokalna primena suđera natoplejnog kurkuminom već 12. dana posle tretmana dovodi do kontrakcije 90% rane. Oralna upotreba kurkumina dala je slične rezultate u pogledu kontrakcije rane, sa maksimalnom kontrakcijom od 6 do 12. dana (Jagetia i Rajanikant, 2012). Kurkumin se pokazao i kao stimulans za proces epitelizacije kod zarastanja rana na modelu pacova u smislu redukcije perioda epitelizacije sa 23 dana na 11 dana (Gokhan i sar, 2017). Takođe, u ovoj studiji, u grupi životinja tretiranih rastvorom KU zabeležena je kompletna epitelizacija alveolarnog grebena kod svih eksperimentalnih grupa već sedmog dana posle ekstrakcije zuba, kao i pojava PAS pozitivnosti bazalne membrane skvamoznog epitela. U kontrolnim grupama, K i NL, ovaj epitel je bio sačinjen od 2 do 5 slojeva slabo orožavajućih keratinocita iznad kubičnog bazalnog sloja, dok je u grupama tretiranim KU i NLKU epitel bio deblji i jasnije stratifikovan.

Rezultati studije Mao i sar. (2015) koja se bavila istraživanjem efekata lokalno aplikovanog CoQ<sub>10</sub> i lasera male energije na zarastanje rana na modelu miševa (kod kojih je prethodno bio indukovao dijabetes), dali su oprečne rezultate. Oni navode značajno poboljšanje u procesu zarastanja posle 3 dana primene kombinovane terapije laserom i CoQ<sub>10</sub> (čak 32%), 61% posle 7 dana tretmana i čak 97% posle 13 dana, dok je 15. dana uočeno potpuno zarastanje kod svih životinja. Međutim, grupa životinja koja je bila tretirana samo lokalno aplikovanim CoQ<sub>10</sub>, bez primene lasera, nije dala statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu. Ovakav nalaz je u suprotnosti sa rezultatima ove studije gde se posle 7 dana aplikacije CoQ<sub>10</sub> koji je enkapsuliran u nanoliposome, kod životinja primećuje najmanje izražen zapaljenski infiltrat. Razlozi za postojanje ovakvih razlika mogu biti mnogobrojni i uključuju sam dizajn eksperimenta gde su Mao i sar. (2015) aplikovali CoQ<sub>10</sub> životinjama kod kojih je prethodno indukovao dijabetes što je samim tim značajno kompromitovalo proces zarastanja rane, ali i to da je u pitanju kutana rana, a ne rana koja se nalazi na sluzokoži

kao u našoj studiji. S druge strane pomenuti eksperiment je izvodjen na miševima, tako da treba ostaviti mogućnost postojanja specifičnih razlika u vrsti životinja imajući u vidu da se naša studija bavila proučavanjem procesa zarastanja rane kod pacova Wistar soja.

Odavno je poznato da povećanje broja fagocitarnih ćelija, poput monocita, makrofaga i neutrofila dovodi do povećane produkcije slobodnih radikala nakon ekstrakcije zuba, obzirom da sve ove ćelije učestvuju u formiranju ROS (Babior, 1984). Reaktivne forme kiseonika su produkt aerobnog metabolizma i imaju značajnu ulogu u pojedinim ćelijskim i biohemijskim procesima, kao što su ćelijska diferencijacija, progresija, intracelularno prenošenje signala, apoptoza i dr. Produkcija ROS je neophodna u procesu zarastanja rana, kako bi zaštitila organizam od patogenih agenasa, obzirom da reaktivne forme kiseonika prouzrokuju indukciju imunog odgovora (Akbik i sar., 2014; Sarsour i sar., 2009). Međutim, povećana produkcija ROS i njihovo prolongirano delovanje, dovodi do oksidativnog stresa tkiva i odlaže proces zarastanja rane (Guo i Dipietro, 2010). Slobodni radikali kiseonika izazivaju oksidativna oštećenja na svim strukturama ćelija izazivajući lipidnu peroksidaciju, oštećenje DNK molekula, inaktivaciju brojnih enzima i proteina u tkivima, što uzrokuje prolongiranje inflamatorne faze zarastanja rane (Mohanty i sar., 2012). Prolongirana inflamatorna faza dovodi do nagomilavanja ROS koji imaju i značajan citotoksičan i prodegenerativni potencijal koji indukuje poremećaj zarastanja rane (Kant i sar., 2014). Sam proces zarastanja rane dovodi do smanjenja aktivnosti enzima koji su uključeni u antioksidantnu zaštitu tkiva, ali i do ne-enzimskih hvatača ROS (Kant i sar., 2014).

Oksidativni stres je značajan faktor u procesu zarastanju rana i generalno inhibiše remodelaciju tkiva (Thangapazham i sar., 2013). Smatra se da se značajna redukcija oksidativnog stresa i ubrzanje procesa zarastanja rana, može postići upotrebom antioksidanasa (Tusi i sar., 2017). Ovo istraživanje se takođe bavilo i uticajem CoQ<sub>10</sub> i KU na nivo oksidativnog stresa posle ekstrakcije zuba, tj. biohemijskim aspektom procesa zarastanja rane, određivanjem vrednosti MDA i AOPP, kao i aktivnosti CAT u homogenatu mekog tkiva koje okružuje postersktracionu ranu.



Malondildehyd (MDA) je molekul male molekularne mase i jedan od krajnjih produkata lipidne peroksidacije, a njegova povećana koncentracija je indikator oksidativnog stresa i već se dugim nizom godina smatra indikatorom procesa lipidne peroksidacije (Ohkawa i sar., 1979). Degradacijom polinezasićenih masnih kiselina, koje su glavi gradivni elementi ćelijske membrane, pod dejstvom ROS dolazi do nastanka MDA. Nastali MDA reaguje sa deoksiadenozinom i deoksiguanozinom u molekulu DNK formirajući različite adukte, od kojih su neki mutageni.

U studijama gde je lokalno aplikovan CoQ<sub>10</sub> na povređeno tkivo pacova, nivo MDA u tkivnom homogenatu bio je značajno manji u odnosu na kontrolnu grupu (Choi i sar., 2009). Rezultati iste studije navode da su značano manje koncentracije MDA u plazmi bile u grupi eksperimentalnih životinja tretiranih oralnim dozama CoQ<sub>10</sub> od 100mg/kg. Ovi rezultati slažu se sa rezultatima naše studije gde su srednje vrednosti MDA u homogenatu mekog tkiva koje okružuje ekstrakcionu ranu bile statistički značajno manje u grupama životinja tretiranih antioksidansima (CoQ<sub>10</sub> i KU), dok su najmanji nivoi MDA zabeleženi u grupi gde su antioksidansi bili enkapsulirani u nanoliposome. Takođe zabeleženo je i postojanje statistički značajne razlike u nivoima MDA između grupa tretiranih slobodnim i enkapsuliranim antioksidansima što ukazuje na značajniji efekat enkapsuliranih antioksidanasa u prevenciji nastanka MDA, odnosno da se enkapsulacijom pomenutih antioksidanasa postiže njihov bolji efekat u prevenciji nastanka MDA.

Pored indirektnog uticaja na nastanak MDA u tkivu, obe formulacije aplikovanih antioksidanasa su se pokazale sposobnim da direktno inhibiraju formiranje lipidnih peroksida (Ak i Gülçin, 2008; Turunen i sar., 2004). Tako KU u koncentraciji od 20 mM sprečava lipidnu peroksidaciju u emulziji linoleinske kiseline (Ak i Gülçin, 2008). Takođe CoQ<sub>10</sub> se pokazao kao odličan u sprečavanju lipidne peroksidacije svih bioloških mebrana, sprečavajući proces inicijacije lipidne peroksidacije, tj. formiranje lipidnih peroksidnih radikala (Turunen i sar., 2004).

AOPP je već dugo prihvaćen kao značajan biomarker oksidativnog stresa i pokazatelj oštećenja proteina. Smatra se značajnim pokazateljem oksidativnog stresa, obzirom da su mete slobodnih radikala formiranih ovim procesom, upravo proteini plazme, ćelije i većina tkiva u organizmu (Perone i sar., 2012). Oštećenje proteina

izazvano slobodni radikalima, nije presudna, ali je svakako reakcija koja ubrzava oštećenje tkiva i vodi u ćelijsku smrt. Takođe smatra se da je AOPP značajan molekul za interakciju između neutrofila i monocita, čime se značajno može doprineti poremećaju imunog odgovora i inflamatornog procesa (Bondy i Campbell, 2016). Pored mogućeg nastanka AOPP-a pod dejstvom ROS skorašnja istraživanja ukazuju i na to da mikroorganizmi koji inficiraju ranu utiču na porast AOPP-a (Cheng i sar., 2013).

U ovom istraživanju po prvi put je pokazano postojanje statistički značajno veće količine AOPP-a u homogenatu mekog tkiva koje okružuje postersktrakcionu ranu, u odnosu na kontrolnu grupu, u sva tri ispitivana termina. Obe forme primenjenih antioksidanasa snizile su količinu AOPP-a u mekom tkivu koje okružuje ranu, a pokazano je i da je enkapsulacija statistički značajno poboljšala aktivnost CoQ<sub>10</sub> i KU.

Katalaza (CAT) je jedan od enzima koji ima sposobnost detoksikacije vodonik peroksida, jednog od produkata oksidativnog oštećenja, koji nastaje kao proizvod aktivnosti superoksid dizmutaze. Ovaj enzim pripada familiji enzima koje sadrže hem u sebi i zastupljen je u različitim tkivima i smešten u intracelularnim organelama kao što su peroksizomi (Nishikawa i sar., 2009). Njegova uloga je u enzimskom uklanjanju vodonik peroksida, ali i superoksid dizmutaze, i pokazalo se kao glavna karika koja dovodi do boljeg zarastanja periodontalnih rana (Aliyev i sar., 2004). U reakciji koju CAT ubrzava iz vodonik peroksida nastaje molekularni kiseonik i voda (Nishikawa i sar., 2009).

Rezultati ove studije ukazuju da enkapsulacija CoQ<sub>10</sub> i KU dovodi do njihovog izraženijeg efekta na nivoe CAT u poređenju sa vrednostima koje su dobijene kod životinja tretirane ovim antioksidansima u slobodnoj formi. Nakon 21. dana aplikacije slobodnih i enkapsuliranih antioksidanasa pokazano je da aplikacija enkapsuliranih formi antioksidanasa statistički značajno povećava aktivnost CAT u odnosu na kontrolu, dok ovakav efekat nije zapažen u grupama koje su tretirane slobodnim formama CoQ<sub>10</sub> i KU. Ovakvi rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima koja su pokazala, u *in vitro* uslovima, da aplikacija KU povećava sintezu mRNK koja kodira sintezu CAT (Howell i sar., 2013). Pored *in vitro* uslova, u *in vivo* modelu zarastanja rane kod miševa sa dijabetesom KU je takođe izazvao povećanje količine mRNK za

CAT u tkivu rane tretiranih životinja (Kant i sar., 2014). Veoma je moguće da KU i indirektno utiče na porasta aktivnosti CAT, jer ima sposobnost da neenzimskim putem prevede superoksidni radikal i nagradi  $H_2O_2$  koji posledično dovodi do blagog porasta aktivnosti CAT (Akbik i sar., 2014). U brojnim kliničkim studijama takođe je pokazano da  $CoQ_{10}$  dovodi do porasta aktivnosti CAT, ali i drugih antiinflamatornih enzima kao što su superoksid dizmutaza i glutacion peroksidaza (Lee i sar., 2013; Kalpravidh i sar., 2005).

Pored uticaja na nivoe CAT, oba ispitivana antioksidansa pokazala su se sposobnim da sami hvataju nastale slobodne radikale i inhibiraju njihov nastanak u *in vitro* uslovima (Ak i Gülçin, 2008; Turunen i sar., 2004). Ovakva vrsta aktivnosti u slučaju KU pokazana je na velikom broju modela gde su generisani različiti slobodni radikali (Ak i Gülçin, 2008), tako da ne treba zanemariti i njihovu direktnu ulogu u regulisanju nivoa ROS koji se nalaze u mekom tkivu koje okružuje postekstrakcionu ranu.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Posle ekstrakcije prednjih inciziva eksperimentalnih grupa pacova kod kojih su lokalno aplikovani antioksidansi (koenzim Q<sub>10</sub> i kurkumin) sa i bez nanolipozoma zapažena je značajna razlika u procesu zarastanja rana u odnosu na K i NL grupu životinja.

2. U K i NL grupi pacova posle 7., 14. i 21. dana zapažen je znatno sporiji tok u procesu zarastanja rana posle ekstrakcije zuba u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe životinja koje su tretirane kurkuminom i koenzimom Q<sub>10</sub> u slobodnoj i enkapsulisanoj formi.

3. Na uzorcima dobijenim 7. dana posle ekstrakcije zuba na patohistološkim presecima svih eksperimentalnih grupa utvrđeno je prisustvo zapaljenskog infiltrata i granulacionog tkiva u gingivalnom i periodontalnom vezivnom tkivu.

4. Infiltracija inflamatornim ćelijama bila je najizraženija u K i NL grupi 7. dana posle ekstrakcije zuba. Epitel je u ovim grupama bio tanak, sačinjen od 2-5 slojeva slabo orožavajućih keratinocita iznad kubičnog bazalnog sloja, dok je u grupama tretiranim antioksidansima u slobodnom i enkapsuliranom obliku bio deblji i jasnije stratifikacije.

5. Imunohistohemijska analiza 7. dana posle ekstrakcije inciziva pokazala je visoku ekspresiju osteopontina u inflamatornom infiltratu i mladom vaskularnom granulacionom tkivu u okolini ekstrakcione rane u svim eksperimentalnim grupama životinja.

6. U K, NL i Q<sub>10</sub> eksperimentalnim grupama životinja imunoreaktivnost na osteopontin bila je najveća 7. dana posle ekstrakcije zuba. U grupama NLQ<sub>10</sub> i KU primetna je značajna redukcija ekspresije osteopontina, dok na uzorcima dobijenim iz grupe NLKU je evidentno smanjena i predstavljena bojenjem slabog intenziteta rasutih ćelija histiocitne i fibroblastne morfologije što pokazuje značajan povoljan efekat na zarastanje rana ovih antioksidanasa enkapsuliranih u nanolipozome.

7. Patohistološkom analizom uzoraka dobijenih žrtvovanjem eksperimentalnih životinja 14. dana posle ekstrakcije zuba uočeno je napredovanje procesa reparacije postekstrakcione rane, sa sazrevanjem granulacionog tkiva, povećanom depozicijom kolagenih vlakana i redukcijom zapaljenskog infiltrata, kao i sa skvamoznim epitelom koji je u celini prekrivao ekstrakcionu ranu kod svih eksperimentalnih grupa životinja. U NLQ<sub>10</sub> grupi zapaženo je potpuno iščezavanje polimorfonukleara iz inflamatornog infiltrata što ukazuje da enkapsuliran koenzim Q<sub>10</sub> ima značajan antiinflamatorni efekat.

8. Četrnaest dana posle ekstrakcije zuba zapaženo je prisustvo mešavine fibrovaskularnog i zrelog, fibroznog granulacionog tkiva sa jasno definisanim krvnim sudovima, diskretnim zapaljenskim infiltratom i debelim, gustim kolagenim snopovima u uzorcima iz NLQ<sub>10</sub> i NLKU grupa za razliku od K grupe gde je uočeno prisustvo dominantno fibrovaskularnog granulacionog tkiva.

9. U eksperimentalnim Q<sub>10</sub> i KU grupama životinja žrtvovanih 14. dana od početka eksperimenta nađen je evidentan pad imunohistohemijske ekspresije sa smanjenim brojem ćelija koje ekspimiraju osteopontin u odnosu na K i NL grupu životinja. Kod NLKU i NLQ<sub>10</sub> eksperimentalnih grupa životinja stepen osteopontinske ekspresije bio je značajno snižen u odnosu na sve ostale grupe životinja.

10. Histopatološka analiza postekstrakcionog tkiva rane kod životinja žrtvovanih posle 21. dana pokazala je keratinizaciju pokrovnog epitela, sa mestimičnom papilomatozom i epitelnim produžecima zaobljenih vrhova koji uranjaju u subepitelno vezivno tkivo. Inflamacija je bila oskudna, zapaljenski infiltrat se jasno uočavao samo na histološkim uzorcima iz grupe K i NL. Ekspresija osteopontina bila je značajno redukovana u svim ispitivanim grupama, a najizraženije smanjena u grupama tretiranih kurkuminom i koenzimom Q<sub>10</sub>.

11. Analiza parametara oksidativnog stresa pokazala je statistički značajne razlike u nivoima MDA, gde su najmanje vrednosti zapažene u grupama tretiranim slobodnim i enkapsuliranim formama kurkumina i koenzima Q<sub>10</sub>, što nesumnjivo ukazuje na njihov značajan antioksidativni efekat.

12. U ovom istraživanju je po prvi put pokazano postojanje statistički značajno povećanje količine AOPP-a u homogenatu mekog tkiva koje okružuje posterkstrakcionu ranu kod K grupe životinja u odnosu na grupe tretirane slobodnim i enkapsuliranim antioksidansima. Obe forme primenjenih antioksidanasa snizile su količinu AOPP-a u mekom tkivu koje okružuje ranu, što nesumnjivo pokazuje da enkapsulacija koenzima Q<sub>10</sub> i kurkumina značajno poboljšava njihovu antioksidativnu zaštitu.

13. Aktivnost katalaze bila je statistički značajno povećana u NLKU i NLQ<sub>10</sub> grupama u odnosu na ostale eksperimentalne grupe, što takođe pokazuje da je enkapsulacija kurkumina i koenzima Q<sub>10</sub> dala najbolje rezultate u očuvanju antioksidativne zaštite.

14. Dobijeni rezultati eksperimentalnog istraživanja mogu poslužiti kao polazna osnova za primenu ovih antioksidanasa u kliničkoj praksi za ubrzavanje procesa zarastanja rana posle ekstrakcije zuba, kao i u smanjenju komplikacija koje mogu nastati posle ovakvih veoma čestih intervencija u stomatološkoj praksi.

## 8. LITERATURA

Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41:40-59.

Akbik D, Ghadiri M, Chrzanowski W, Rohanizadeh R. Curcumin as a wound healing agent. *Life Sci.* 2014; 116:1-7.

Ak T, Gülçin I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact.* 2008; 174:27-37.

Ali-Erdem M, Burak-Cankaya A, Cemil-Isler S, Demircan S, Soluk M, Kasapoglu C, Korhan C. Extraction socket healing in rats treated with bisphosphonate: Animal model for bisphosphonate related osteonecrosis of jaws in multiple myeloma patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011; 16:e879-883.

Aliyev E, Sakallioğlu U, Eren Z, Acikgoz G. The effect of polylactide membranes on the levels of reactive oxygen species on periodontal flaps during wound healing. *Biomaterials.* 2004; 25:4633-4637.

Aller MA, Arias JL, Arias JI, Sanchez-Patan F, Arias J. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. *Med Hypotheses.* 2007; 68:202-209.

Anand P, Nair H, Sung B, Kunnumakkara A, Yadav V, Tekmal R, Aggarwal BB. Design of curcumin loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity *in vitro* and superior bioavailability *in vivo*. *Biochem Pharmacol.* 2010; 79:330-338.

Anamika B. Extraction of curcumin. *J Environ Sci Toxicol Food Technol.* 2012; 1:1-16.

- Babior BM. The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest.* 1984; 73:599-601.
- Barry J, Fritz M, Brender JR, Smith PE, Lee DK, Ramamoorthy A. Determining the effects of lipophilic drugs on membrane structure by solid-state NMR spectroscopy: The case of the antioxidant curcumin. *J Am Chem Soc.* 2009; 131:4490–4498.
- Baxter R, Bramlett K, Onel E, Daniels S. Impact of local administration of liposome bupivacaine for postsurgical analgesia on wound healing: a review of data from ten prospective, controlled clinical studies. *Clin Ther.* 2013; 35:312-320.
- Bentinger M, Tekle M, Dallner G. Coenzyme Q-biosynthesis and functions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 396:74-79.
- Bishop A. Role of oxygen in wound healing. *J Wound Care.* 2008; 17:399-402.
- Blair P, Flaumenhaft R. Platelet  $\alpha$ -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* 2009; 23:177-189.
- Blakytyn R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med.* 2006; 23:594-608.
- Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 117:12S-34S.
- Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Hinz B. The myofibroblast in wound healing and fibrosis: answered and unanswered questions. 2016. *F1000Res* 5, doi:10.12688/f1000research.8190.1 (2016).
- Bondy SC, Campbell A. Inflammation, aging and oxidative stress. Humana Press. Springer International Publishing, Switzerland, 2016; 2197-7224.
- Boreková M, Hojerová J, Koprda V, Bauerová K. Nourishing and health benefits of coenzyme Q<sub>10</sub>. *Czech J Food Sci.* 2008; 26:229-241.



Borena BM, Martens A, Broeckx SY, Meyer E, Chiers K, Duchateau L, Spaas JH. Regenerative skin wound healing in mammals: state-of-the-art on growth factor and stem cell based treatments. *Cell Physiol Biochem*. 2015; 36:1-23.

Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Internat J Nanomed*. 2015; 10: 975-999.

Campos AC, Groth AK, Branco AB. Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008; 11:281-288.

Cheng PG, Phan CW, Sabaratnam V, Abdullah N, Abdulla MA, Kuppusamy UR. Polysaccharides-rich extract of *Ganoderma lucidum* (M.A. Curtis:Fr.) P. Karst accelerates wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Evid-Based Complem Alter Med*. 2013; 2013:671252.

Cheng TL, Wu YT, Lai CH, I sar. Thrombomodulin regulates keratinocyte differentiation and promotes wound healing. *J Invest Dermatol*. 2013; 133:1638-1645.

Chen X, Zou L, Niu J, Liu W, Peng SH, Liu CM. The stability, sustained release and cellular antioxidant activity of curcumin nanoliposomes. *Molecules*. 2015; 20:14293-14311.

Childs DR, Murthy AS. Overview of wound healing and management. *Surg Clin N Am*. 2017; 97:189-207.

Chimento S, Billero V, Cavallin L, Romanelli M, Nadji M, Romanelli P. Evaluation of osteopontin expression in chronic wounds: a potential prognostic and therapeutic biomarker. *J Wound Care*. 2017; 26:S4-S8.

Choi BS, Song HS, Kim HR, Park TW, Kim TD, Cho BJ, Kim CJ, Sim SS. Effect of coenzyme Q<sub>10</sub> on cutaneous healing in skin-incised mice. *Arch Pharm Res*. 2009; 32:907-913.

Cordero MD, Alcocer-Gómez E, Culic O, Carrión AM, de Miguel M, Díaz-Parrado E, Pérez-Villegas EM, Bullón P, Battino M, Sánchez-Alcazar JA. NLRP3 inflammasome is activated in fibromyalgia: The effect of coenzyme Q<sub>10</sub>. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20:1169-1180.

Dai M, Zheng X, Xu X, Kong X, Li X, Guo G, Luo F, Zhao X, Wei YQ, Qian Z. Chitosan-alginate sponge: preparation and application in curcumin delivery for dermal wound healing in rat. *J Biomed Biotechnol*. 2009; 2009:595126.

Darby IA, Zakuan N, Billet F, Desmouliere A. The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair. *Cell Mol Life Sci*. 2016; 73:1145-1157.

Davis SC, Ricotti C, Cazzaniga A, Welsh E, Eaglstein WH, Mertz PM. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Repair Regen*. 2008; 16:23-29.

de Abreu FAM, Ferreira CL, Silva AB, Paulo Cde O, Miziara MN, Silveira FF, Alves JB. Effect of PDGF-BB, IGF-I growth factors and their combination carried by liposomes in tooth socket healing. *Braz Dent J*. 2013; 244:299-307.

Dedej T, Lamaj E, Marku N, Osterni V, Bialis S. Alterations in homeostasis after open surgery. A prospective randomized study. *G Chir*. 2013; 34:202-209.

Delavary BM, Veer WM, Egmond M, Niessen FB, Beelen RHJ. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiol*. 2011; 216:753-62.

Del Rosso J Wound care in the dermatology office: Where are we in 2011? *J Am Acad Dermatol*. 2011. 64:S1-7.

Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest*. 2001; 107:1055-1061.

Dhanrajani PJ, Onaidel OJ. Trismus: Aethiology, differential diagnosis and treatment Oral surgery. 2002; 29:88-94.

Durgaprasad S, Reeresh R, Hareesh K, Rajput R. Effect of topical curcumin preparation (BIOCURCUMAX) on burn wound healnig in rats. J Pharm Biomed Sci. 2011; 8:1-3.

Edwards R, Harding KG. Bacteria and wound healing. Curr Opin Infect Dis. 2004; 17:91-96.

El- Amin SF, Hogan MV, Allen AA, Hinds J, Laurencin CT. The indications and use of bone morphogenic proteins in foot, ankle, and tibia surgery. Foot Ankle Clin. 2010; 15:543-551.

Elvidge GP, Glenny L, Appelhof RJ, Ratcliffe PJ, Ragoussis J, Gleadle JM. Concordant regulation of gene expression by hypoxia and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibition. The role of HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , and other pathways. J Biol Chem. 2006; 281:15215-15226.

Eming SA, Hammerschmidt M, Krieg T, Roers A. Interrelation of immunity and tissue repair on regeneration. Semin Cell Dev Biol. 2009; 20:517-527.

Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. Surgery. 2008; 26:31-37.

Fakhrabadi MA, Ghotrom AZ, Mozaffari-Khosravi H, Nodoushan HH, Nadjarzadeh A. Effect of Coenzyme Q<sub>10</sub> on oxidative stress, glycemic control and inflammation in diabetic neuropathy: a double blind randomized clinical Trial. Int J Vitam Nutr Res. 2014; 84:252-260.

Fanciullino R, Ciccolini J. Liposome-encapsulated anticancer drugs: still waiting for the magic bullet? Curr Med Chem. 2009; 6:4361-4373.

Farina R., Trombelli L. Wound healing of extraction sockets. Endodontic Topics. 2012; 25:16-43.

Feng T., Wei Y., Lee JR., Zhao L. Liposomal curcumin and its application in cancer. *Int J Nanomed.* 2017; 12:6027-6044.

Ferreira CL, Abreu FA, Silva GA, Silveira FF, Barreto LB, Paulino Tde P, Miziara MN, Alves JB. TGF- $\beta$ 1 and BMP-4 carried by liposomes enhance the healing process in alveolar bone. *Archives Oral Biol.* 2013; 58:646-656.

Ferreira H, Matamá T, Silva R, Silva C, Gomesc AC, Cavaco-Paulo A. Functionalization of gauzes with liposomes entrapping an anti-inflammatory drug: A strategy to improve wound healing. *React Funct Polym.* 2013; 73:1328-1334.

Flora G, Gupta D, Tiwari A. Nanocurcumin: a promising therapeutic advancement over native curcumin. *Crit Rev Therapeut Drug Carr Syst.* 2013; 331-368.

Freedberg IM, Tomić-Canić M, Komine M, Blumenberg M. Keratins and the keratinocyte activation cycle. *J Invest Dermatol.* 2001; 116:633-640.

Galili U, Wigglesworth K, Abdel-Motal UM. Accelerated healing of skin burns by anti-Gal/ $\alpha$ - gal liposomes interaction, *Burns.* 2010; 36: 239-251.

Garin G, Mathews M, Berk BC. Tissue - resident bone marrow - derived progenitor cells. Key players in hypoxia - induced angiogenesis. *Circ Res.* 2005; 97:955-957.

Gokhan E, Zerrin OC, Yildiray K, Ozlem CE, Levent T, Suat T, Özgür A, Demirci M, Dursun E. The effect of curcumin on wound healig in a rat modelof nasal mucosal trauma. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017; 2017:9452392.

Goldberg MT, Han YP, Yan C, Shaw MC, Garner WL. TNF-alpha suppresses alphasmooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing. *J Invest Dermatol* 2007; 127:2645–2655.

Goldsmith LA. Urednik. *Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the Skin*, Oxford University Press. USA: New York, 1991.

Gorustovich AA, Steimetz T, Nielsen FH, Guglielmotti MB. Histomorphometric study of alveolar bone healing in rats fed a boron-deficient diet. *Anat Rec (Hoboken)*. 2008; 291:441-447.

Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision reference range. *Clin Chim Acta*. 1991; 196:143-152.

Grunder U, Polizzi G, Goene R, Hatano N, Henry P, Jackson WJ, Kawamura K, Köhler S, Renouard F, Rosenberg R, Triplett G, Werbitt M, Lithner B. A 3-year prospective multicenter follow-up report on the immediate and delayed-immediate placement of implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999; 14:210-216.

Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 2010; 89:219-229.

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453:314-321.

Gupta N, Singh K, Sharma S. Hematoma - A complication of posterior superior alveolar nerve block. *J Dent Probl Solut*. 2015; 2:15-16.

Hasan M, Belhaj N, Benachour H, Barberi-Heyob M, Kahn CJ, Jabbari E, Linder M, Arab-Tehrany E. Liposomes encapsulation of curcumin: physicochemical characterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferation. *Int J Pharm*. 2014; 461:519–528.

Häussinger D. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochem J* 1996; 313:697-710.

Hupp JR. Preprosthetic surgery. *Contemporary Oral and Maxillofacial surgery*. 2008; 5 th ed. Philadelphia: Mosby.

Hussain Z, Ei-Thu H, Shiow-Fern N, Shahzeb K, Katas H. Nanoencapsulation, an efficient and promising approach to maximize wound healing efficacy of curcumin: A review of new trends and state-of-the art. *Coll Surf B: Biointerfaces*. 2017; 150:223-241.

Howell JC, Chun E, Farrell AN, Hur YH, Caroti CM, Iuvone PM, Haque R. Global microRNA expression profiling: Curcumin (diferuloylmethane) alters oxidative stress-responsive microRNAs in human ARPE-19 cells. *Molec Vis*. 2013; 19:544-560.

Ivanovski S, Li H, Daley T, Bartold PM. An immunohistochemical study of matrix molecules associated with barrier membrane-mediated periodontal wound healing. *J Periodontal Res*. 2000; 35:115-126.

Jagetia G, Rajanikant G. Acceleration of wound repair by curcumin in the excision wound of mice exposed to different doses of fractionated gamma radiation. *Int Wound J*. 2012; 9:76-92.

Kalpravidh RW, Wichit A, Siritanaratkul N, Fucharoen S. Effect of coenzyme Q10 as an antioxidant in beta-thalassemia/Hb E patients. *Biofactors*. 2005; 25: 225-234.

Kant V, Gopal A, Pathak NN, Kumar P, Tandan KS, Kumar D. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int Immunopharm*. 2014; 20:322-330.

Kawasaki K, Shimizu N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers Surg Med*. 2000; 26:282-291.

Khosravi-Darani K, Mozafari MR. Nanoliposome potential in nanotherapy: a concise overview. *Int J Nanosci Nanotechnol*. 2010; 6:3-13.

Kocić G, Tomović K, Kocić H, Sokolović D, Djordjević B, Stojanović S, Arsić I, Smelcerović A. Antioxidative, membrane protective and antiapoptotic effects of melatonin, in silico study of physico-chemical profile and efficiency of nanoliposome delivery compared to betaine. *RSC Adv*. 2017; 7:1271-1281.

Kolokythas A, Olech E, Miloro M. Alveolar ostitis: A comprehensive review of concepts and controversis. *Inernat J Dent.* 2010; ID 249073.

Kujath P, Michelsen A. Wounds-from physiology to wound dressing. *Dtsch Arztebl Int.* 2008; 105:239-248.

Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci.* 2003; 18:65-70.

Larson BJ, Longaker MT, Lorenz HP. Scarless fetal wound healing: a basic science review. *Plast Reconstr Surg.* 2010; 126:1172-1180.

Lee B, Tseng Y, Yen C, Lin P. Effects of coenzyme Q<sub>10</sub> supplementation (300 mg/day) on antioxidation and anti-inflammation in coronary artery disease patients during statins therapy: a randomized, placebo-controlled trial. *Nutr J.* 2013; 12:142.

Lee WC, Tsai TH. Preparation and characterization of liposomal coenzyme Q<sub>10</sub> for in vivo topical application. *Internat J Pharmaceut.* 2010; 395:78-83.

Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.* 2007; 25:9-18.

Luo H, Gary O, Rankin GO, Lihanzi L, Daddysman MK, Jiang BH, Chen YC. Kaempferol inhibits angiogenesis and VEGF expression through both HIF dependent and independent pathways in human ovarian cancer cells. *Nutr Canc.* 2009; 61:554-563.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-275.

Manca ML, Castangia I, Zaru M, Nácher A, Valenti D, Fernández-Busquets X, Fadda AM, Manconi M. Development of curcumin loaded sodium hyaluronate immobilized vesicles (hyaluroses) and their potential on skin inflammation and wound restoring, *Biomaterials*. 2015; 71:100-109.

Marien M. Trismus: causes, differential diagnosis and treatment. *Gen Dent*. 1997; 45:350-355.

Martinotti S, Ranzato E. Dynamic interplay between cell types during wound healing. In: Ranzato E, urednik. *Keratinocytes: Structure, Molecular Mechanisms and Role in Immunity*. Hauppage: Nova Publishers Inc, 2013. 1-12.

Mao Z, Wu HJ, Dong T, Wu XM. Additive enhancement of wound healing in diabetic mice by low level light and topical CoQ<sub>10</sub>. *Nature*. 2015; 1-7.

Medzhitov R. Inflammation 2010: New adventures of an old flame. *Cell*. 2010; 14:771-776.

Mehrbani D, Farjam M, Geramizadeh B, Tanideh N, Amini M, Panjehshahin MR. The healing effect of curcumin on burn wounds in rat. *World J Plast Surg*. 2015; 4:29-35.

Mendes RM, Silva GAB., Caliari MV, Silva EE, Ladeira LO, Ferreira AJ. Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. *Life Sci*. 2010; 87:215-222.

Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF. Impaired wound healing. *Clin Dermatol*. 2007; 25:19-25.

Middleton, JE. (2011) *Wound Healing: Process, Phases, and Promoting*. New York: Nova Science Publishers, Inc.



Mitić A, Todorović K, Stojiljković N, Stojanović N, Ilić S, Todorović A, Stojnev S. Beneficial effects of curcumin on the wound-healing process after tooth extraction. *Nat Prod Commun.* 2017; 12:1905-1908.

Mohanty C, Das M, Sahoo S. Sustained wound healing activity of curcumin loaded oleic acid based polymeric bandage in rat model. *Mol Pharm.* 2012; 9:2801-2811.

Monaco JL, Lawrence T. Acute wound healing. An overview. *Clin Plastic Surg.* 2003; 30:1-12.

Mourats S, Lazar AN, Markoutsas E, Duyckaerts C, Antimisiaris SG. Multifunctional nanoliposomes with curcumin-lipid derivative and brain targeting functionality with potential application for Alzheimer disease. *Eur J Med Chem.* 2014; 80:175-183.

Mori R, Shaw TJ, Martin P. Molecular mechanisms linking wound inflammation and fibrosis: knockdown of osteopontin leads to rapid repair and reduced scarring. *J Exp Med.* 2008; 205:43-51.

Morsy MA, El-Moselhy MA. Mechanism of protective effect of curcumin against indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Pharmacology.* 2013; 91:267-274.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8:958-969.

Mozafari MR. Nanoliposomes: preparation and analysis. *Methods Mol Biol.* 2010; 605:29-50.

Mozafari MR, Mortazavi SM. Nanoliposomes: From fundamentals to recent developments. Trafford Publishing Ltd, Oxford, UK. 2005.

Nishikawa M, Hashida M, Takaura Y. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009; 61: 319-326.

Novak P, Olas B, Wachowicz B. Oxidative stress in hemostasis. *Post Bioch.* 2010; 56:239-247.

Nwomeh BB, Yager DR, Cohen IK. Physiology of the chronic wound. *Clin Plast Surg.* 1998; 25:341-356.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95:351-358.

Ongstad E, Bouta EM, Roberts JE, Uzarski JS, Gibbs SE, Sabel MS, Cimmino VM, Roberts MA, Goldman J. Lymphangiogenesis-independent resolution of experimental edema. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010; 299:H46-H54.

Oschman LJ, Chevalier G, Brown R. The effects of grounding (earthing) on inflammation, the immune response, wound healing, and prevention and treatment of chronic inflammatory and autoimmune diseases. *J Inflamm Res.* 2015; 8:83-96.

Park K. Nanotechnology: What it can do for drug delivery. *J Control Release.* 2007; 120:1-3.

Perrone S, Tataranno ML, Stazzoni G, Buonocore G. Biomarkers of oxidative stress in fetal and neonatal diseases. *J Mat-Fet Neonat Med.* 2012; 25:2575-2578.

Pirani D, Evans LAR, Cook DI, Young JA. Intracellular pH in the rat mandibular salivary gland: the role of Na-H and Cl-HCO<sub>3</sub> antiports in secretion. *Pflügers Archiv.* 1987; 408: 178-184.

Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology.* 2007; 10:803-815.

Pryor WA, Stanley JP. Letter: A suggested mechanism for the production of malondialdehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J. Org. Chem.* 1975; 40: 3615-3617.

Redd MJ, Cooper L, Wood W, Stramer B, Martin P. Wound healing and inflammation: embryos reveal the way to perfect repair. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci.* 2004; 359:777-784.

Reed RK, Rubin K. Transcapillary exchange: role and importance of the interstitial fluid pressure and the extracellular matrix. *Cardiovasc Res.* 2010; 87:211-217.

Reinke JK, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012; 49:35-43.

Ribatti D, Conconi MT, Nussdorfer GG. Nonclassic endogenous regulators of angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2007; 59:185-205.

Ridiandries A, Bursill C, Tan J. Broad-spectrum inhibition of the CC-chemokine class improves wound healing and wound angiogenesis. *Int J Mol Sci.* 2017; DOI:10.3390/ijms18010155.

Robinson PM, Blalock TD, Yuan R, Lewin AS, Schultz GS. Hammerhead ribozyme - mediated knockdown of mRNA for fibrotic growth factor s: transforming growth factor - beta 1 and connective tissue growth factor. *Methods Mol Biol.* 2012; 820:117-132.

Rodero MP, Khosrotehrani K. Skin wound healing modulation by macrophages. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2010; 3:643-653.

Romo T, Pearson JM, Yalamanchili H, et al. Wound healing, skin. *E-medicine specialties.* Available at: <http://www.emedicine.com/ent/topics13.htm>. Accessed May 12, 2016.

Sale ST, Parvez H, Yeltiwar R, Vivekanandan G, Pundir AJ, Jain P. A comparative evaluation of topical and intrasulcular application of coenzyme Q<sub>10</sub> (Perio Q TM) gel in chronic periodontitis patients: A clinical study. *J Ind Soc Periodont.* 2014; 18:461-465.

Sarsour EH, Kumar MG, Chaudhuri L, Kalen AL, Goswami PC. Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antiox Red Sig.* 2009; 11:2985-3011.

Shcarsthul A, Mutaers H, Pennings S, Szarek W, Russel F, Wagener F. Curcumin-induced fibroblast apoptosis and in vitro wound contraction are regulated by antioxidants and heme oxygenase: implication for scar formation. *J Cell Mol Med.* 2009; 13:712-725.

Singh RK, Rai D, Yadav D, Bhargava A, Balzarini J, De Clercq E. Synthesis, antibacterial and antiviral properties of curcumin bioconjugates bearing dipeptide, fatty acids and folic acid. *Eur J Med Chem.* 2010; 45:1078-1086.

Singh MR, Saraf S, Vyas A, Jain V, Singh D. Innovative approaches in wound healing: Trajectory and advances. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2013; 41:202-212.

Slavich GM, Irwin MR. From stress to inflammation and major depressive disorder: A social signal transduction theory of depression. *Psychol Bull.* 2014; 140:774-815.

Sortino F, Cicciu M. Strategies used to inhibit postoperative swelling following removal of impacted lower third molar. *Dent Res J.* 2011; 8:162-171.

Sultana J, Molla MR, Kamal M, Shahidullah M, Begum F, Bashar MA. Histological differences in wound healing in maxillofacial region in patients with or without risk factors. *Bangladesh J Pathol.* 2009; 24:3-8.

Sun WT, Zou Y, Guo YP, Wang L, Xiao X, Sun R, Zhao K. Construction and characterization of curcumin nanoparticles system. *J Nanopart Res.* 2014; 16:1723–1728

Tallgren A. The continuing reduction of the residual alveolar ridges in complete denture wearers: A mixed- longitudinal study covering 25 years. *J Prosthet Dent.* 2003; 89:427-435.

Thangapazam R, Sharad S, Maheshwari R. Skin regenerative potentials of curcumin. *Biofactors*. 2013; 39:141-149.

Thorne CH. *Grabb and Smith's plastic surgery*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.

Tracy LE, Minasian RA, Caterson EJ. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. *Advances in wound care*. 2016; 5:119-136.

Todorović K, Jovanović G, Todorović A, Mitić A, Stojiljković N, Ilić S, Stojanović N, Stojnev S. Effects of coenzyme Q<sub>10</sub> encapsulated in nanoliposomes on wound healing processes after tooth extraction. *J Dent Sci*. 2017; DOI: 10.1016/j.jds.2017.10.004.

Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3: 349-363.

Topman G, Lin F, Gefen A. The natural medication for wound healing - curcumin, aloe-vera and ginger- do not induce a significant effect on the migration kinematics of cultured fibroblast. *J Biomech*. 2013; 46:170-174.

Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011; 63:131-135.

Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1660:171-199.

Tusi SK, Manesh TE, Mahmood SF, Bagheria A. Can tert-butylhydroquinone improve the healing of extracted tooth socket in rats? *Dent Res J (Isfahan)*. 2017; 14:8-12.

Vázquez-González ML, Calpena AC, Domènech Ò, Montero MT, Borrell JH. Enhanced topical delivery of hyaluronic acid encapsulated in liposomes: A surface-dependent phenomenon. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 2015; 134:31-39.

Vukelić S, Stojadinović O, Pastar I, Rabach M, Krzyzanowska A, Lebrun E, Davis SC, Resnik S, Brem H, Tomic, Canic M. Cortisol synthesis in epidermis is induced by IL-1 and tissue injury. *J Biol Chem*. 2011; 286:10265-10275.

Xiang Q, Xiao J, Zhang H, Zhang X, Lu M, Zhang H, Su Z, Zhao W, Lin C, Huang Y, Li X. Preparation and characterisation of bFGF-encapsulated liposomes and evaluation of wound-healing activities in the rat. *Burns*. 2011; 37:886-895.

Yoneda T, Tomofuji T, Kawabata Y, Ekuni D, Azuma T, Kataoka K, Kunitomo M, Morita M. Application of coenzyme Q<sub>10</sub> for accelerating soft tissue wound healing after tooth extraction in rats. *Nutrients*. 2014; 6:5756-5769.

Zing JM, Hasan ST, Meydani M. Molecular mechanism of hypolipidemic effects of curcumine. *Biofactors*. 2013; 39:101-121.

Wiig H. Pathophysiology of tissue fluid accumulation in inflammation. *J Physiol*. 2011; 589:2945-2953.

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kid Int*. 1996; 49:1304-1305.

Wozniak P, Kontek B, Rozanski W, Olas B. Evaluation of hemostasis parameters and the role of oxidative damage to plasma proteins in the modulation of hemostasis in patients with nephrolithiasis before and after extracorporeal shock wave lithotripsy. *PloS ONE*. 2017; 12:e0185157.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Kosta Todorović rođen je 12.10.1970. godine u Nišu. Osnovnu školu i srednje usmereno obrazovanje završio je u Nišu i stekao zvanje Laboratorijski tehničar za fiziku.

Medicinski fakultet u Nišu, odsek stomatologija, upisao je školske 1989/90 god a diplomirao maja 1995. god sa prosečnom ocenom 8,14. Nakon obavljenog lekarskog staža položio je stručni ispit juna 1996. god.

Magistarske studije na Medicinskom fakultetu u Nišu upisao je školske 1995/96 god. i tezu pod naslovom „Makromorološki i mikromorološki efekti biolampe na zarastanje rana nakon ekstrakcije zuba - eksperimentalna studija" odbranio je decembra 2001. god i time stekao akademski naziv magistar medicinskih nauka iz oralne hirurgije.

Specijalistički ispit iz oblasti Oralne hirurgije na Medicinskom fakultetu u Nišu položio je sa odličnim uspehom decembra 2000. god.

Školske 2014/15 god. upisao je III godinu doktorskih studija iz oblasti stomatoloških nauka na Medicinskom fakultetu u Nišu.

U stalnom radnom odnosu je na Klinici za stomatologiju u Nišu od marta 1999. god., a od juna 2016. god zasniva radni odnos na Medicinskom fakultetu u Nišu u zvanju asistenta na predmetu Oralna hirurgija.

Oženjen je, otac dvoje dece.

## Изјава 1.

### ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

#### **ЕФИКАСНОСТ КОЕНЗИМА Q10 И КУРКУМИНА ЕНКАПСУЛИРАНИХ У НАНОЛИПОЗОМЕ КОД ЗАРАСТАЊА МЕКИХ ТКИВА НАКОН ЕКСТРАКЦИЈЕ ЗУБА: ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА СТУДИЈА**

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, \_\_\_\_\_

Потпис аутора дисертације:

---

Коста М. Годоровић



## Изјава 2.

### ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Наслов дисертације: **ЕФИКАСНОСТ КОЕНЗИМА Q10 И КУРКУМИНА  
ЕНКАПСУЛИРАНИХ У НАНОЛИПОЗОМЕ КОД ЗАРАСТАЊА МЕКИХ  
ТКИВА НАКОН ЕКСТРАКЦИЈЕ ЗУБА: ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА СТУДИЈА**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, \_\_\_\_\_

дисертације:

Потпис аутора

---

Коста М. Годоровић

### Изјава 3:

#### ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

#### **ЕФИКАСНОСТ КОЕНЗИМА Q10 И КУРКУМИНА ЕНКАПСУЛИРАНИХ У НАНОЛИПОЗОМЕ КОД ЗАРАСТАЊА МЕКИХ ТКИВА НАКОН ЕКСТРАКЦИЈЕ ЗУБА: ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА СТУДИЈА**

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

**3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)**

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, \_\_\_\_\_

дисертације:

Потпис аутора

---

Коста М. Тодоровић