



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ**

**Јелена Рајковић**

**УПОРЕДНА АНАЛИЗА ЕФЕКТА ХОЛЕКАЛЦИФЕРОЛА  
И АЛФАКАЛЦИДОЛА КАО САСТАВНИХ ДЕЛОВА  
ИМПЛАНТАТА НА ПРОЦЕС ЗАРАСТАЊА ДЕФЕКТА У  
ФЕМУРУ ОВАРИЕКТОМИСАНИХ ПАЦОВА**

**Докторска дисертација**

**Крагујевац, 2015.**

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b>I Аутор</b>
Име и презиме: Јелена Рајковић
Датум и место рођења: 23.09.1982. године, Ниш
Садашње запослење: Универзитет у Нишу, Природно-математички факултет, Департман за биологију и екологију, звање асистент
<b>II Докторска дисертација</b>
<b>Наслов: Упоредна анализа ефеката холекалциферола и алфакалцидола као саставних делова имплантата на процес зарастања дефеката у фемуру оваријектомисаних пацова</b>
Број страница: 167
Број слика: 5 табела, 13 графика, 37 слика
Број библиографских података: 325
Установа и место где је рад израђен: Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет
Научна област (УДК): Биологија/Физиологија животиња и молекуларна биологија: 57 / 591.1 / 577.2
Ментор: Проф. др Стево Ј. Најман, Медицински факултет, Универзитет у Нишу
<b>III Оцена и одбрана</b>
Датум пријаве теме: 10.09.2014. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Др Стево Ј. Најман, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу (ментор), ужа научна област: Биологија;</li> <li>2. Др Андраш Ш. Штајн, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња;</li> <li>3. Др Бранка И. Огњановић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија;</li> <li>4. Др Љубиша Б. Ђорђевић, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу, ужа научна област: Зоологија.</li> </ol>
Комисија за оцену докторске дисертације: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Др Стево Ј. Најман, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу (ментор), ужа научна област: Биологија;</li> <li>2. Др Андраш Ш. Штајн, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња;</li> <li>3. Др Бранка И. Огњановић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија;</li> <li>4. Др Љубиша Б. Ђорђевић, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу, ужа научна област: Зоологија.</li> </ol>
Датум одбране докторске дисертације:

Експериментални део ове докторске дисертације урађен је на Институту за Биомедицинска истраживања Медицинског факултета у Нишу у оквиру пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под називом „Виртуелни коштаноглобни систем и његова примена у претклиничкој и клиничкој пракси“ (III41017).

Захваљујем се свим дивним људима који су омогућили реализацију ове докторске тезе и допринели њеном квалитету.

Посебну захвалност дугујем ментору, проф. др Стеви Најману, на дугогодишњем учешћу у креирању и подстицању мог научног духа као и на подршци, стрпљењу, личном ангажовању у изради експеримента и неискрпним разговорима који су преточени у ову докторску дисертацију. Хвала Вам на слободи коју сте ми дали у истраживању и путоказима који ми нису дозволили да се у њој изгубим.

Захваљујем се мојим професорима, проф. др Андрашу Штајну и проф. др Бранки Огњановић на великој помоћи током свих фаза докторских студија, корисним сугестијама приликом писања и учешћу у последњој фази крунисања овог рада.

Професору Љубиши Ђорђевић велико хвала на помоћи у реализацији експеримента, искреним саветима и садржајним разговорима који су олакшали мој пут ка остварењу циља.

Велика ми је част да изразим захвалност особи која је одговорна за моју љубав према лабораторији и електронској микроскопији, професору Војину Савићу, на несебичном подучавању и могућности да будем део изузетне лабораторије.

Целој екипи Института за Биомедицинска истраживања и Виваријума Медицинског факултета у Нишу се од срца захваљујем на предусретљивости, несебичној помоћи, а пре свега пријатељству које ми је пуно значило током свих ових година. Лаборанту Малинки Ранђеловић изнад свега хвала што ме је обучила за рад у лабораторији и била ми помоћ и подршка током обраде добијених узорака.

Захваљујем се професорки др Татјани Цветковић што је омогућила реализацију дела експеримента у својој лабораторији и допринела тумачењу добијених резултата.

Колегиници Сањи Стојановић велико хвала на експерименталној и теоријској помоћи у свим фазама израде ове докторске дисертације.

Николи Дрезгић и Милошу Боричићу хвала на могућности израде радиолошких снимака на „Medica 3DCT“ скенеру, док Николи Коруновићу дугујем огромну захвалност на помоћи око њихове обраде и тумачења.

Професорки Зорици Ајдуковић хвала на пријатељски указаној помоћи и предусретљивости која је увек наишла у право време.

Захваљујем се пријатељици Марији Војводић на корекцијама енглеског текста током писања рада и сажетка докторске тезе.

Од срца се захваљујем мојој великој породици са Департмана за Биологију и екологију на трпеливости и подршци која ми је изнад свега значила. Професору и

пријатељу Наташи Јоковић сам бескрајно захвална на подизању мог духа, помоћи и ослоњу онда када је било најтеже.

Жики, Салету, Ђури, Маријани, Педи, Андреи и Гаги велико Хвала на пријатељству, статистичкој обуци и техничкој подрици захваљујући којој мој докторат данас овако изгледа.

На крају могу да кажем да је највеће богатство у животу имати љубав, ослонац и разумевање због чега неизмерну захвалност дугујем својим родитељима и брату који су заслужни за оно што ја данас Јесам.

Безгранично се захваљујем мојој Љубави на потпуној посвећености чак и у тренуцима моје духовне неприсутности, снажној подрици и подстреку који су ми дали снагу да издржим до Краја.

Јелена Рајковић

---

## СКРАЋЕНИЦЕ

1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1,25-дихидроксивитамин Д <sub>3</sub> , калцитриол
PTH (1-34)	рекомбинанти 1-34 фрагмент хуманог паратиroidног хормона, терипаратид
1α(OH)D <sub>3</sub>	1α-хидроксивитамин Д <sub>3</sub> , алфакалцидол
25(OH)D <sub>3</sub>	25-хидроксивитамин Д <sub>3</sub> , калцидиол
ALP	алкална фосфатаза
AP	кисела фосфатаза
APCs	антиген презентујуће ћелије
BMD	минерална густина кости
BD	густина кости
BMP	коштани морфогенетски протеин
Ca	калцијум
CD4 <sup>+</sup>	позитиван кластер диференцијације 4
CD8 <sup>+</sup>	позитиван кластер диференцијације 8
CT	компјутеризована томографија
CBVT	волуметријска томографија са конусним снопом
c-Jun	компонента AP-1 транскрипционог фактора
DAB	диаминобензидин (3,3'-diaminobenzidine).
EDTA	етилендиаминтетрасирћетна киселина
EGF	епидермални фактор раста
ER	рецептор за естроген
ERα	рецептор за естроген типа α
ERβ	рецептор за естроген типа β
FGF	фактор раста фибробласта
HAp	хидроксиапатит
IgG	имуноглобулин класе Г
IGF	фактор раста налик инсулину
IL-1	интерлеукин 1
IL-10	интерлеукин 10
IL-12	интерлеукин 12
IL-17	интерлеукин 17
IL-21	интерлеукин 21
IL-6	интерлеукин 6
IL-8	интерлеукин 8
M-CSF	фактор који стимулише колоније макрофага
BMM	минерални матрикс кости
NaOH	натријум хидроксид

OC	остеокалцин
OPG	остеопротегерин
OP	остеопонтин
P	фосфор
PBS	фосфатни пуфер
PDGF	тромбоцитни фактор раста
PLGA	поли(лактид-ко-гликолид)
PLP	периодат-лизин-параформалдехид
PRP	плазма обогаћена тромбоцитима
PTH	паратироидни хормон
RANK	рецепторски активатор за нуклеарни фактор кВ
RANKL	лиганд за рецептор који активира нуклеарни фактор Кб
SEM	скенирајућа електронска микроскопија
TGF- $\beta$	трансформишући фактор раста-бета
Th17	помоћничке Т ћелије типа 17
Th1	помоћничке Т ћелије типа 1
Th2	помоћничке Т ћелије типа 2
TNF- $\alpha$	фактор некрозе тумора-алфа
TRAP	тартарат резистентна кисела фосфатаза
VDR	рецептор за витамин Д
VEGF	васкуларни ендотелни фактор раста
VOI	волумен од интереса

---

### Списак табела

- Табела 1.** Концентрација естрадиола (pmol/L) у серуму оваријектомисаних и лажно оперисаних пацова током периода од четири месеца
- Табела 2.** Биохемијски маркери у серуму оваријектомисаних и лажно оперисаних пацова током периода од четири месеца
- Табела 3.** Радиографска густина кости у дисталном делу фемура оваријектомисаних и лажно оперисаних пацова измерена након три и четири месеца од операције
- Табела 4.** Биохемијски маркери у серуму оваријектомисаних пацова након периода регенерације од две недеље
- Табела 5.** Биохемијски маркери у серуму оваријектомисаних пацова након периода регенерације од осам недеља

### Списак графика

- График 1.** Промена масе оваријектомисаних и лажно оперисаних пацова (g) током периода од четири месеца
- График 2.** Концентрација естрадиола (pmol/L) у серуму оваријектомисаних и лажно оперисаних пацова током периода од четири месеца
- График 3.** Концентрација калцијума (mmol/L) у серуму оваријектомисаних и лажно оперисаних пацова током периода од четири месеца
- График 4.** Концентрација фосфора (mmol/L) у серуму оваријектомисаних и лажно оперисаних пацова током периода од четири месеца
- График 5.** Активност алкалне фосфатазе (U/L) у серуму оваријектомисаних и лажно оперисаних пацова током периода од четири месеца
- График 6.** Активност киселе фосфатазе (U/L) у серуму оваријектомисаних и лажно оперисаних пацова током периода од четири месеца
- График 7.** Радиографска густина кости измерена у оквиру VOI у дисталном делу фемура оваријектомисаних и лажно оперисаних пацова, три месеца након операције
- График 8.** Радиографска густина кости измерена у оквиру VOI у дисталном делу фемура оваријектомисаних и лажно оперисаних пацова, четири месеца након операције
- График 9.** Биохемијски маркери у серуму оваријектомисаних пацова након периода регенерације од две и осам недеља
- График 10.** Процент новоформиране кости у дефекту након периода регенерације од две недеље
-

- График 11.** Процент новоформиране кости у дефекту након периода регенерације од осам недеља
- График 12.** Процент нересорбованог материјала у дефекту након периода регенерације од две недеље
- График 13.** Процент нересорбованог материјала у дефекту након периода регенерације од осам недеља

### Списак слика

- Слика 1.** Изглед здраве и остеопоротичне кости
- Слика 2.** Фазе регенерације кости
- Слика 3.** Начини локалне апликације агенаса коришћених у третману остеопоротичних фрактура и дефеката
- Слика 4.** Синтеза и активација витамина Д
- Слика 5.** Физиолошка улога витамина Д у одржавању хомеостазе калцијума
- Слика 6.** Структура активних форми витамина Д које се користе у третману остеопорозе
- Слика 7.** Радиолошки снимци фемура оваријектомисаних и лажно оперисаних пацова
- Слика 8.** Хистолошка слика дефеката у СР групи оваријектомисаних пацова, две недеље након операције
- Слика 9.** Калус у дефекту СР групе, две недеље након операције
- Слика 10.** Хистолошка слика дефеката у СЦ групи оваријектомисаних пацова, две недеље након имплантације
- Слика 11.** Калус у дефекту СЦ групе, две недеље након имплантације
- Слика 12.** Фиброзно ткиво и новоформирано спољашње калус код пацова из СЦ групе, две недеље након имплантације
- Слика 13.** Хистолошка слика дефеката у ХЦ групи оваријектомисаних пацова, две недеље након имплантације
- Слика 14.** Калус у дефекту ХЦ групе, две недеље након имплантације
- Слика 15.** Хистолошка слика дефеката у АЦ групи оваријектомисаних пацова, две недеље након имплантације
- Слика 16.** Калус у дефекту АЦ групе, две недеље након имплантације
- Слика 17.** Грануломатозна реакција са мултинуклеарним гигантским ћелијама око места дефекта у АЦ групи пацова, две недеље након имплантације
- Слика 18.** Хистолошка слика дефеката у СР групи оваријектомисаних пацова, осам недеља након операције
-



- Слика 19.** Калус у дефекту СР групе, осам недеља након операције
- Слика 20.** Хистолошка слика дефеката у СЦ групи овариектомисаних пацова, осам недеља након имплантације
- Слика 21.** Калус у дефекту СЦ групе, осам недеља након имплантације
- Слика 22.** Хистолошка слика дефеката у ХЦ групи овариектомисаних пацова, осам недеља након имплантације
- Слика 23.** Калус у дефекту ХЦ групе, осам недеља након имплантације
- Слика 24.** Хистолошка слика дефеката у АЦ групи овариектомисаних пацова, осам недеља након имплантације
- Слика 25.** Калус у дефекту АЦ групе, осам недеља након имплантације
- Слика 26.** Имуноекспресија остеопонтинина у дефектима код остепоротичних пацова из испитиваних група након периода регенерације од две недеље
- Слика 27.** Имуноекспресија остеопонтинина у дефектима код остепоротичних пацова из испитиваних група након периода регенерације од осам недеља
- Слика 28.** Имуноекспресија остеокалцина у дефектима код остепоротичних пацова из испитиваних група након периода регенерације од две недеље
- Слика 29.** Имуноекспресија остеокалцина у дефектима код остепоротичних пацова из испитиваних група након периода регенерације од осам недеља
- Слика 30.** СЕМ микрографије дефекта у СР групи овариектомисаних пацова након периода регенерације од две недеље
- Слика 31.** СЕМ микрографије дефекта у СЦ групи овариектомисаних пацова након периода регенерације од две недеље
- Слика 32.** СЕМ микрографија дефекта у ХЦ групи овариектомисаних пацова након периода регенерације од две недеље
- Слика 33.** СЕМ микрографије дефекта у АЦ групи овариектомисаних пацова након периода регенерације од две недеље
- Слика 34.** СЕМ микрографија дефекта у СР групи овариектомисаних пацова након периода регенерације од осам недеља
- Слика 35.** СЕМ микрографија дефекта у СЦ групи овариектомисаних пацова након периода регенерације од осам недеља
- Слика 36.** СЕМ микрографија дефекта у ХЦ групи овариектомисаних пацова након периода регенерације од осам недеља
- Слика 37.** СЕМ микрографија дефекта у АЦ групи овариектомисаних пацова након периода регенерације од осам недеља
-

## Упоредна анализа ефеката холекалциферола и алфакалцидола као саставних делова имплантата на процес зарастања дефеката у фемуру овариектомисаних пацова

### ИЗВОД

Постменопаузна остеопороза је системска скелетна болест која се карактерише смањеном коштаном масом и нарушеном микроархитектуром кости које су последица недостатка естрогена. Смањена синтеза естрогена у менопаузи доводи до нарушеног баланса између разградње и изградње кости, услед чега долази до губитка коштаног ткива у појединим деловима скелета и настанка фрактура. Остеопороза представља велики проблем у стоматологији и ортопедији због смањеног капацитета остеопоротичне кости да обезбеди неопходну потпору имплантатима и омогући адекватну фиксацију прелома.

Зарастање фрактура у остеопоротичним условима је отежано због чега је пожељно коришћење лекова и коштаних заменика који би унапредили регенерацију кости и ојачали преломљено место. Показано је да витамин Д и његови аналози, који се користе у превенцији и третману остеопорозе, повољно утичу на зарастање прелома. Међутим, високе дозе овог витамина које су неопходне за остваривање директних анаболичких ефеката на кост, доводе до појаве хиперкалцемије. Како би се избегли нежељени ефекти системске администрације високих доза витамина Д, једна од могућности је њихова локална примена у место дефекта.

Главни циљ докторске дисертације је испитивање утицаја локално примењених холекалциферола и алфакалцидола, као саставних делова имплантата сачињених од минералног матрикса кости (ММК) и плазме обogaћене тромбоцитима (PRP), на процес зарастања дефеката у остеопоротичној кости пацова. Упоредни преглед остеогених ефеката холекалциферола и алфакалцидола, као и поређење добијених резултата са спонтаном регенерацијом остеопоротичне кости и регенерацијом уз помоћ имплантата састављених само од минералног матрикса кости и PRP, су такође анализирани у оквиру дисертације. С тим у вези, циљ дисертације је и успостављање и верификовање експерименталног модела остеопорозе изазване овариектомијом женки пацова *Wistar* соја који би био погодан за овакву врсту истраживања.

Према постављеним циљевима истраживања урађене су две експерименталне студије. У првој студији експериментална остеопороза је изазвана билатералном овариектомијом и време које је потребно за развој остеопоротичних знакова и настанак промена у феморалној кости је процењивано ендокринолошким, биохемијским и радиолошким методама. У оквиру друге експерименталне студије, након добијања модела остеопорозе код пацова, креирани су дефекти до костне сржи у дисталном делу оба фемура. Дефекти су остављени да спонтано зарастају (CP група) или су испуњавани имплантатима сачињеним од минералног матрикса кости и PRP, који су

примењени сами (СЦ група), или у комбинацији са испитиваним формама витамина Д, холекалциферолом (ХЦ група) и алфакалцидолом (АЦ група). Минерални матрикс кости се иначе користи као коштани заменик и скафолд за насељавање ћелија, а у овим испитивањима је служио и као носач за PRP и испитиване форме витамина Д. За праћење регенерације остеопоротичне кости коришћене су биохемијске, хистолошке, имунохистохемијске, хистоморфометријске и скенинг-електрономикроскопске методе и анализирани су периоди две недеље и осам недеља од креирања дефеката у фемуру пацова.

Резултати прве студије показују да је до значајног опадања концентрације естрадиола, након његових почетних флукуација, дошло у трећем месецу након оваријектомије пацова *Wistar* соја. Активности ензима ALP и AP су повишене током испитиваног периода у групи оваријектомисаних пацова, док је концентрација Ca у серуму нижа у четвртом, а концентрација P у другом месецу након оваријектомије у односу на пацове из контролне групе. Радиолошка анализа је показала смањење коштане густине у дисталном делу фемура након три месеца од оваријектомије.

Резултати друге студије показују да локално примењени холекалциферол и алфакалцидол, у коришћеном експерименталном дизајну и примењеној дози, одлажу рани процес зарастања кости и спречавају настанак фиброзе код оваријектомисаног модела пацова. Обе испитиване форме витамина Д смањују ресорпцију партикула ММК у месту дефекта, што представља сметњу за формирање нове кости у групи третираној алфакалцидолом. Алфакалцидол доводи до настанка слабо минерализованог калуса који се карактерише интензивном балансираном ремоделацијом, компактношћу и добром интеграцијом у околну остеопоротичну кост. Под утицајем холекалциферола развија се велика количина калуса који се одликује добром минерализацијом, али такође и порозношћу и слабом интеграцијом, што су карактеристике калуса сличне оним у групи са спонтаном регенерацијом.

Холекалциферол и алфакалцидол су показали бројне ефекте у коришћеном експерименталном дизајну на основу којих се може сугерисати њихова примена као потенцијалних агенаса у решавању различитих проблема у регенерацији остеопоротичне кости. Избор одговарајуће форме витамина Д, као и биоматеријала који би био коришћен као имплантат за попуњавање дефеката у кости, треба бити направљен у складу са циљем третмана.

Резултати ове докторске дисертације су допринос бољем разумевању механизма деловања алфакалцидола и холекалциферола на регенерацију остеопоротичне кости, са практичном применом у отварању нових терапеутских приступа лечењу дефеката кости у остеопоротичним условима.

---

---

## **Comparative analysis of the effects of cholecalciferol and alfacalcidol as integral parts of the implants on the healing of femur defects in ovariectomized rats**

### **SUMMARY**

Postmenopausal osteoporosis is a systemic skeletal disease caused by lack of estrogen and characterized by low bone mass and impaired microarchitecture. Reduced synthesis of estrogen in menopause leads to impaired balance between bone resorption and bone formation, causing a loss of bone tissue in some parts of the skeleton and susceptibility to fractures. Osteoporosis is a major problem in dentistry and orthopedics due to reduced capacity of osteoporotic bone to provide the necessary support to implants and enable adequate fracture fixation.

Osteoporotic fractures are very difficult to heal in osteoporotic conditions, therefore, it is favourable to use drugs and bone substitutes that will improve the bone regeneration and strengthen the site of the fracture. It has been shown that vitamin D and its analogues, which are widely used in the treatment of osteoporosis, have a positive effect on the healing of fractures. However, high doses of vitamin D, which are necessary for obtaining the direct anabolic effects on bone, lead to the appearance of hypercalcemia. To avoid side effects of systemic administration of high vitamin D doses, one of the possibilities is their local application into the site of defect.

The main objective of this PhD thesis is to examine the impact of cholecalciferol and alfacalcidol, as integral parts of the implants consisting of bone mineral matrix (BMM) supplemented with platelet-rich plasma (PRP), on femur defect healing in osteoporotic rat bone. Comparative overview of osteogenic effect of cholecalciferol and alfacalcidol as well as comparison of results with the spontaneous regeneration of osteoporotic bone and regeneration with the help of implants composed only of BMM and PRP, were also analyzed in the dissertation. In this regard, the aim of the dissertation is to establish and verify an experimental model of osteoporosis in *Wistar* rats that is suitable for this type of research.

According to the objectives of the research, two experimental studies were conducted. In the first study, experimental osteoporosis was induced by bilateral ovariectomy and the time required for development of osteoporotic conditions and the occurrence of changes in femoral bone was evaluated by using endocrinological, biochemical and radiological analysis. In the second experimental study, after obtaining osteoporotic rat model, defects were created up to the bone marrow in the distal part of the both femoral diaphysis. The defects were left to heal spontaneously (SR group) or filled with implants composed of bone mineral matrix supplemented with PRP, applied alone (SC group), or as carriers for the examined forms of vitamin D, cholecalciferol (HC group) and alfacalcidol (AC group). Bone mineral matrix serves as a bone substitute and a scaffold for cell colonization, and in these studies it has also served as a carrier for the PRP and tested forms of vitamin D.

---

Healing of defects and the quality of the newly formed bone tissue were observed by biochemical, histological, immunohistochemical, histomorphometric and scanning electron microscopy analyses. Regeneration process was monitored two and eight weeks after the creation of defects in the femurs of rats.

Results of the first study show that a significant decline in estradiol concentration, after its initial fluctuations, occurred in the third month after ovariectomy. The ALP and AP activity in serum were increased during the examined period, while the concentration of Ca was lower in the fourth and the concentration of P in the second month after ovariectomy compared to control rats. Radiographic analysis showed decrease in bone density in the distal part of the femur, three months after ovariectomy.

Results of the second study show that locally applied cholecalciferol and alfacalcidol, in the used experimental design and applied doses, delay early bone healing and prevent fibrosis in ovariectomized rat model. Both of the examined vitamins decreased the resorption of BMM particles in defects which is a barrier to the formation of new bone in the group treated with alfacalcidol. Alfacalcidol leads to the formation of poorly mineralized callus which is characterized by intense balanced remodeling, compactness and good integration with the surrounding osteoporotic bone. A large amount of callus develops under the influence of cholecalciferol and it is characterized by good mineralization, but also porosity and weak integration, which are characteristics of callus similar to those in the group with spontaneous regeneration.

Cholecalciferol and alfacalcidol showed many effects in the used experimental design on the basis of which their use as potential agents in solving various problems related to the osteoporotic bones regeneration can be assessed. The choice of the appropriate form of vitamin D, as well as biomaterials that would be used as an implant to fill bone defects, should be made in accordance with the objective of treatment.

The results of this PhD thesis contribute to a better understanding of the mechanisms of alfacalcidol and cholecalciferol actions in osteoporotic bone regeneration, with practical application in opening new therapeutic approach to the treatment of bone defects in osteoporotic conditions.

---

## Садржај

<b>1. УВОД.....</b>	<b>1</b>
1.1. Постменопаузна остеопороза .....	2
1.1.1. Структура остеопоротичне кости .....	3
1.1.2. Утицај естрогена на кост и ефекти његовог недостатка .....	5
1.2. Регенерација остеопоротичне кости .....	8
1.2.1. Третман остеопоротичних фрактура .....	11
1.2.1.1. Анти-остеопоротична терапија и зарастање фрактура.....	11
1.2.1.2. Локални приступ лечењу фрактура и дефеката у остеопоротичној кости .....	15
1.2.1.3. Коришћење фактора раста у регенерацији остеопоротичне кости .....	19
1.3. Витамин Д и његова улога у регенерацији остеопоротичне кости .....	22
1.3.1. Витамин Д.....	22
1.3.2. Физиолошка улога витамина Д.....	24
1.3.2.1. Регулација минералне хомеостазе .....	24
1.3.2.2. Директан утицај витамина Д на кост .....	26
1.3.3. Витамин Д и имунски систем .....	27
1.3.4. Витамин Д и остеопороза.....	28
1.3.5. Преглед досадашњих сазнања о утицају витамина Д на процес зарастања остеопоротичних фрактура и дефеката.....	32
<b>2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА .....</b>	<b>35</b>
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ .....</b>	<b>38</b>
3.1. Материјал.....	39
3.2. Експерименталне животиње .....	39

---

3.3. Експериментални дизајн .....	40
3.3.1. Студија 1: Експериментална остеопороза .....	40
3.3.2. Студија 2: Регенерација остеопоротичне кости .....	41
3.4. Добијање експерименталне остеопорозе методом билатералне овариектомије .....	43
3.5. Модел дефекта у фемуру овариектомисаног пацова.....	43
3.6. Припрема имплантата.....	44
3.6.1. Добијање препарата аутологне плазме обогаћене тромбоцитима .....	44
3.6.2. Композиција имплантата.....	45
3.7. Жртвовање и узимање узорака крви и костију .....	45
3.8. Анализа ендокринолошких и биохемијских параметара у серуму пацова .....	46
3.8.1. Одређивање концентрације естрадиола .....	46
3.8.2. Одређивање биохемијских маркера коштаног метаболизма (Са, Р, ALP, AP) .....	46
3.9. Анализа костију методом волуметријске томографије на апарату са конусним снопом .....	46
3.9.1. Мерење радиографске густине костију у дисталном делу фемура.....	47
3.10. Хистолошка анализа .....	50
3.10.1. Фиксација.....	50
3.10.2. Декалцинација .....	50
3.10.3. Испирање узорака .....	51
3.10.4. Дехидратација, калупљење и сечење узорака .....	51
3.10.5. Бојење добијених пресека .....	52
3.11. Хистоморфометријска анализа.....	53
3.12. Имунохистохемијска анализа .....	53
3.13. СЕМ анализа.....	54
3.14. Статистичка анализа података.....	55

---

<b>4. РЕЗУЛТАТИ</b> .....	<b>56</b>
4.1. Експериментална остеопороза.....	57
4.1.1. Телесна маса животиња током експерименталног периода .....	57
4.1.2. Ендокринолошки и биохемијски маркери у серуму пацова .....	59
4.1.2.1. Концентрација естрадиола у серуму испитиваних пацова .....	59
4.1.2.2. Биохемијски маркери коштаног метаболизма у серуму испитиваних пацова.....	62
4.1.3. Резултати радиолошке анализе костију .....	67
4.1.3.1. Густина кости у дисталном делу фемура.....	68
4.2. Регенерација остеопоротичне кости уз помоћ имплантата са витамином Д .....	72
4.2.1. Биохемијски маркери коштаног метаболизма у серуму испитиваних пацова.....	72
4.2.1.1. Период регенерације од две недеље.....	72
4.2.1.2. Период регенерације од осам недеља .....	74
4.2.2. Хистолошка анализа дефеката у остеопоротичној кости.....	77
4.2.2.1. Дефекти након периода зарастања од две недеље .....	77
4.2.2.1.1. Спонтана регенерација остеопоротичне кости .....	77
4.2.2.1.2. Регенерација остеопоротичне кости уз помоћ имплантата сачињених од минералног матрикса кости и PRP .....	79
4.2.2.1.3. Регенерација остеопоротичне кости уз помоћ имплантата са холекалциферолом .....	81
4.2.2.1.4. Регенерација остеопоротичне кости уз помоћ имплантата са алфакалцидолом .....	83
4.2.2.2. Дефекти након периода зарастања од осам недеља.....	86
4.2.2.2.1. Спонтана регенерација остеопоротичне кости .....	86
4.2.2.2.2. Регенерација остеопоротичне кости уз помоћ имплантата сачињених од минералног матрикса кости и PRP .....	87
4.2.2.2.3. Регенерација остеопоротичне кости уз помоћ имплантата са холекалциферолом .....	89

---



4.2.2.2.4. Регенерација остеопоротичне кости уз помоћ имплантата са алфакалцидолом .....	91
4.2.3. Имунохистохемијска анализа дефеката у остеопоротичној кости.....	93
4.2.3.1. Остеопонтин у месту дефекта.....	93
4.2.3.1.1. Период регенерације од две недеље.....	93
4.2.3.1.2. Период регенерације од осам недеља .....	94
4.2.3.2. Остеокалцин у месту дефекта .....	96
4.2.3.2.1. Период регенерације од две недеље.....	96
4.2.3.2.2. Период регенерације од осам недеља .....	97
4.2.4. СЕМ анализа дефеката у остеопоротичној кости .....	99
4.2.4.1. Дефект након периода регенерације од две недеље .....	99
4.2.4.2. Дефекти након периода регенерације од осам недеља.....	103
4.2.5. Хистоморфометријска анализа дефекта .....	106
4.2.5.1. Хистоморфометријска анализа новоформиране кости у дефекту.....	106
4.2.5.1.1. Период регенерације од две недеље.....	106
4.2.5.1.2. Период регенерације од осам недеља .....	107
4.2.5.2. Хистоморфометријска анализа нересорбованог материјала у дефекту.	108
4.2.5.2.1. Период регенерације од две недеље.....	108
4.2.5.2.2. Период регенерације од осам недеља .....	108
<b>5. ДИСКУСИЈА .....</b>	<b>110</b>
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ.....</b>	<b>140</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>143</b>

---

# **1. УВОД**

## 1.1. Постменопаузна остеопороза

Коштано ткиво представља динамичан систем подложен сталном ремоделирању. Балансиран процес ремоделације доприноси очувању коштане масе, омогућава поправке насталих микроштећења и има улогу у одржавању минералне хомеостазе (Brandi, 2009). Услед поремећаја у ремоделацији може доћи како до губитка кости тако и до претеране депозиције коштаног ткива.

Остеопороза представља системски скелетни поремећај који се карактерише смањеном коштаном масом и оштећеном микроархитектуром кости услед чега оне постају фракилне и подложне преломима при минималној трауми. У основи ове болести је патолошки процес ремоделирања са доминантном активношћу ћелија које разграђују кост, остеокласта, и смањеном активношћу ћелија које изграђују кост, остеобласта, чиме се нарушава постојећи баланс и долази до убрзаног губитка коштаног ткива.

Остеопороза може бити примарна и секундарна. Типови примарне остеопорозе су идиопатска, постменопаузна и старосна остеопороза што указује на њену појаву у свим узрастима и независно од пола. Секундарна остеопороза се јавља као последица болести или примене различитих лекова (остеопороза изазвана глукокортикоидима).

Најчешћи облик болести је постменопаузна остеопороза која се јавља код жена након периода менопаузе. До развоја болести долази услед престанка функције јајника и недостатка естрогена, женског полног хормона који има значајну улогу у коштаном метаболизму и одржавању интегритета коштаног ткива (Riggs и сар., 1998).

Недостатак естрогена доводи до повећања броја ремоделационих јединица у кости са нарушеним балансом између процеса формирања и разградње (небалансираног ремоделирања) што узрокује убрзан губитак коштаног ткива у појединим деловима скелета (Lerner, 2006). Најчешће фрактуре у остеопорози су фрактуре кичмених пршљенова, кука и дисталног дела подлактице.

Постменопаузна остеопороза представља значајан здравствени проблем на шта указује податак да у Европи, више од 30% жена старости изнад 50 година болује од ове болести као и да је ризик за настанак фрактура у овој популацији >40% (Melton, 1995).

Остеопороза се другачије назива “тихи крадљивац костију“ због асимптоматског губитка коштане масе који може довести до настанка спонтаних микрофрактура или фрактура узрокованих слабом траумом. Настанак фрактура је најчешће први знак болести при чему се након прве, повећава инциденца појаве поновних фрактура. Остеопоротични преломи настали услед губитка коштаног ткива представљају велику опасност за пацијенте који болују од остеопорозе јер је њихово зарастање отежано у остеопоротичним условима. Они су значајан узрок морбидитета, инвалидитета па чак и морталитета у случају честих компликација насталих након прелома кука. Са проблемима повезаним са остеопорозом се срећу многе гране медицине. У ортопедији, због смањене чврстине кости долази до великог броја неуспелих фиксација (Strømsøe, 2004) док у стоматологији, губитак алвеоларне кости доводи до развоја парадонтопатије (Hildebolt, 1997). У имплантологији се јавља проблем са осеоинтеграцијом због смањеног капацитета остеопоротичне кости да обезбеди неопходну потпору имплантатима (Alghamdi и сар., 2014).

С обзиром да је остеопороза широко распрострањена међу женама након 50. године живота, као и да услед продужења животног века преломи заузимају епидемијске размере, њена превенција и лечење представљају битан фактор у циљу спречавања могућих последица.

### **1.1.1. Структура остеопоротичне кости**

Основна улога костију је у изградњи скелета који штити унутрашње органе и пружа механичку потпору организму.

Коштано ткиво је изграђено из минералног матрикса у форми хидроксиапатита и органског матрикса, који је највећим делом сачињен из колагена типа I.

Према структури, разликују се компактна (кортикална) кост и сунђераста (спонгиозна, трабекуларна) кост чији је однос различит у зависности од дела скелета као и дела кости који се посматра. На попречном пресеку дугих костију као што је фемур, густа кортикална кост заузима спољашњи део, док унутрашњи слој чини спонгиозна кост која је шупљикаве грађе. Док су пршљенови и метафизни крајеви дугих костију већински изграђени из спонгиозне кости, дијафизе дугих костију се

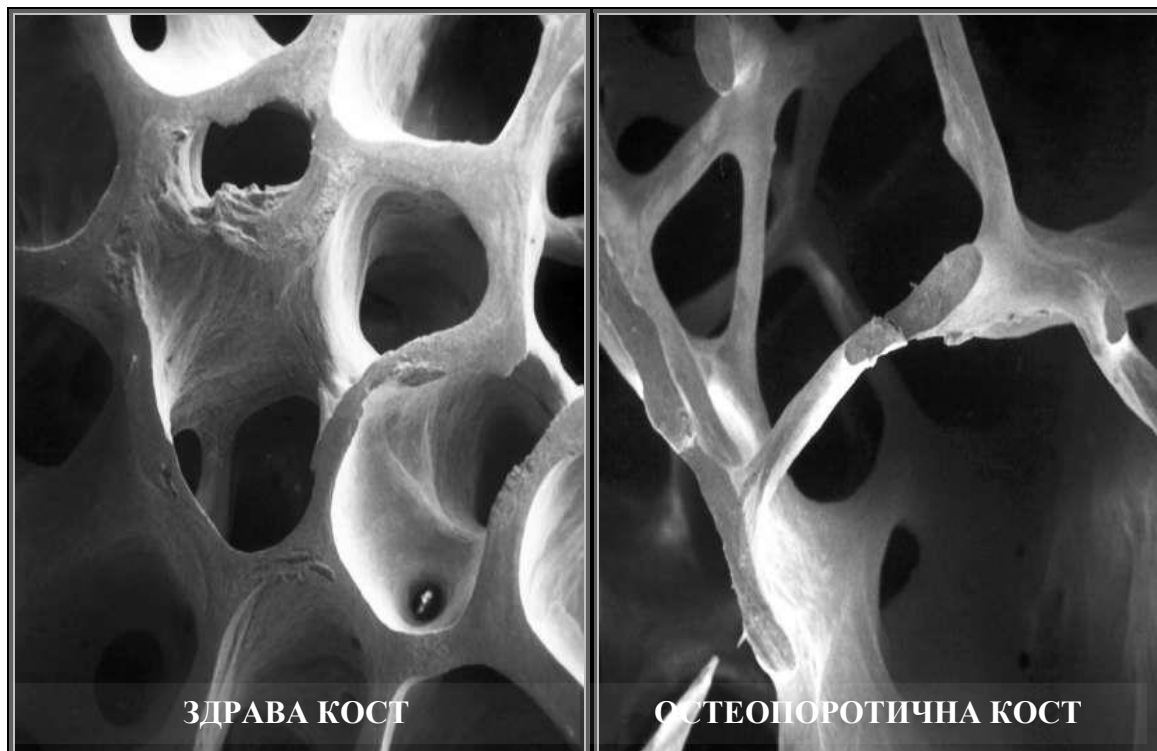
састоје углавном из кортикалне кости која окружује централну шупљину испуњену костном сржи.

Основна структурна и функционална (ремоделациона) јединица компактне кости је остеон или хаверзов систем који је изграђен из концентричних слојева компактног коштаног ткива који се називају ламеле. Колагени фибрили у ламелама су паралелно распоређени око централне шупљине у којој се налазе крвни судови, нерви и растресито везивно ткиво (Clarke, 2008).

Са спољашње стране кортикална кост је прекривена омотачем, периостом, док је унутрашња страна, на граници са спонгиозној кости, прекривена ендостом. Периост представља мембрану густо пакованог фиброзног везивног ткива и његова активност игра важну улогу у регенерацији кости. Ендост је место интензивне ремоделације и појачане ресорпције кости у условима повећаног коштаног ремоделирања (Clarke, 2008).

Спонгиозна кост се састоји из трабекула расутих у одељку костне сржи које су такође изграђене из остеона (Dempster и сар., 2006). Метаболички је активна и због велике контактне површине са околним ћелијама које учествују у ремоделацији, губитак коштаног ткива настао услед небалансираног ремоделирања карактеристичног за остеопорозу се првенствено манифестује у овом делу кости.

Код остеопоротичних пацијената, спонгиозну кост карактерише разређена трабекуларна мрежа (**Слика 1**) до које долази услед смањења величине и броја трабекула (Мајумдар и сар., 1997). Кичма и метафизни крајеви дугих костију су делови скелета богати спонгиозном кости тако да се на њима може најпре уочити њен недостатак. Због тога су ови делови скелета најподложнији остеопоротичним фрактурама.



**Слика 1.** Изглед здраве и остеопоротичне кости (преузето и модификовано из извора: (Dempster и сар., 1986))

Кортикална кост је такође подложна променама у остеопорози, али у мањој мери у односу на спонгиозу (Brandi, 2009). Промене на кортикалној кости огледају се у њеном истањењу услед ендокортикалне ресорпције чиме се повећава пречник централне шупљине кости. До смањења густине кортикалне кости долази услед повећања њене порозности (Väänänen и Härkönen, 1996; Seebeck и сар., 2005).

### 1.1.2. Утицај естрогена на кост и ефекти његовог недостатка

Механизми деловања естрогена на коштани метаболизам као и последице његовог недостатка у менопаузи нису у потпуности познати. Оно што се зна је да он има улогу у инхибицији процеса ресорпције кости (Riggs, 2000).

Естроген остварује ефекте на кост делујући директно, преко естрогених рецептора (ER) присутних у ћелијама кости (Oursler и сар., 1991; Onoe и сар., 1997; Hou

и сар., 2006), и индиректно, захваљујући присуству ER на ћелијама имунског система. Услед његовог недостатка, ћелије имунског система мењају секрецију цитокина укључених у коштани метаболизам, промовишући ресорпцију кости (Pacifici, 1996; Suda и сар., 1999).

Коштане ћелије поседују два типа естрогенних рецептора који након активације учествују у транскрипцији гена у ћелији регулишући на тај начин њену активацију и функцију. Рецептор за естроген типа  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) је експримиран у остеобластима и остеокластима, док је рецептор за естроген типа  $\beta$  (ER $\beta$ ) експримиран само у остеобластима (Turner и сар., 1994). Активација ER у зрелим остеокластима доводи до инхибиције њихове ресорптивне функције (Taranta и сар., 2002), док активација ER у прогениторима остеокласта доводи до инхибиције њихове диференцијације у зреле остеокласте (Shevde, Bendixen et al. 2000; Srivastava, Toraldo et al. 2001).

Остеобласти имају главну улогу у процесу диференцијације остеокласта због експресије фактора који стимулише колоније макрофага (M-CSF) и лиганда за рецептор који активира нуклеарни фактор  $\kappa$ B (RANKL), неопходних за остеокластогезу (Boyse и Xing, 2007). Везивањем RANKL за његов рецептор RANK на прогениторима остеокласта, у присуству M-CSF, долази до диференцијације прекурсора остеокласта у зреле мултинуклеарне остеокласте. Интеракција између RANKL лиганда и RANK рецептора је регулисана експресијом лажног рецептора за RANKL, остеопротегерина (OPG), на ћелијама остеобласне/стромалне ћелијске линије (Khosla, 2001). Остеопротегерин, везујући се за RANKL, спречава RANKL-RANK интеракцију која би водила ка остеокластогенези.

Захваљујући присуству ER у незрелим остеокластима, естроген директно супресује RANKL индуковану остеокластогенезу преко инхибиције c-Jun аминок терминалне киназе у RANK сигналном путу (Shevde и сар., 2000; Srivastava и сар., 2001).

С друге стране, делујући преко ER у остеобластима и стромалним ћелијама, естроген индиректно утиче на диференцијацију остеокласта и разградњу кости тако што повећава експресију OPG (Hofbauer и сар., 1999; Saika и сар., 2001), док смањује експресију M-CSF (Sarma и сар., 1998). Естроген смањује и експресију RANKL на ћелијама костне сржи (Eghbali-Fatourehchi и сар., 2003) и услед његове дефицијенције у постменопаузној остеопорози долази до повећане експресије овог лиганда који игра

кључну улогу у процесу ресорпције кости (Eghbali-Fatourehchi и сар., 2003). Утицај естрогена на експресију RANKL у стромалним ћелијама костне сржи је вероватно индиректан, преко утицаја на секрецију интерлеукина 1 (IL-1), фактора некрозе тумора-алфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлеукина 6 (IL-6), који су познати као проресорптивни цитокини (Palmqvist и сар., 2002; Kwan и сар., 2004). Естроген спречава синтезу IL-1 и TNF- $\alpha$  у моноцитима и ћелијама костне сржи, као и IL-6 у стромалним ћелијама и остеобластима, и на тај начин супримира ресорпцију кости (Girasole и сар., 1992; Pacifici, 1996).

Код жена у менопаузи, као и код оваријектомисаних пацова, забележена је повећана секреција проресорптивних цитокина (Pacifici и сар., 1991; Passeri и сар., 1993; Kimble и сар., 1996; Pacifici, 1996). Код животиња које су дефицијентне за неки од њих не долази до губитка кости након оваријектомије (Poli и сар., 1994; Lorenzo и сар., 1998; Roggia и сар., 2001) што указује на њихову важност у механизмима који доводе до повећане ресорпције кости у условима смањене концентрације естрогена. Ово исто важи и за M-CSF, чија је експресија код оваријектомисаних мишева повећана под утицајем IL-1 и TNF- $\alpha$  (Kimble и сар., 1996), док његов недостатак не дозвољава губитак кости након оваријектомије.

Поред утицаја на ресорпцију, активација естрогених рецептора у остеобластима стимулише изградњу кости и спречава апоптозу остеобласта (Turner и сар., 1994).



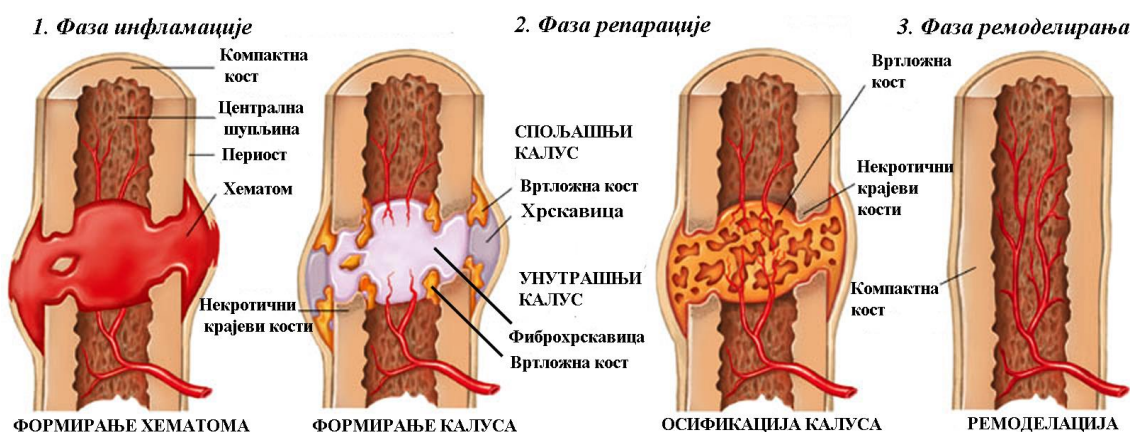
## 1.2. Регенерација остеопоротичне кости

Иако је познато да коштано ткиво најчешће спонтано зараста, код остеопоротичних прелома је спонтана регенерација најчешће онемогућена. Кост захваћена остеопорозом је смањеног биолошког капацитета и има ограничен репарациони потенцијал те је због тога процес њене регенерације отежан (Cesnjaј и сар., 1991).

Мезенхимске ћелије изоловане из костне сржи индивидуа са постменопаузном остеопорозом имају нижу стопу раста, слабији пролиферативни одговор и смањену способност остеогене диференцијације (Rodríguez и сар., 1999). Ћелије кости остеопоротичних пацијената показују и смањен одговор на механички стрес (Sterck и сар., 1998).

Процес зарастања кости пролази кроз три кључне фазе које се преклапају: фаза инфламације, фаза репарације и фаза ремоделирања (Lyritis, 2010) (Слика 2).

Фаза акутне инфламације која настаје одмах након повреде достиже максимум након 24 часа и завршава се око недељу дана након настанка фрактуре. Карактерише се настанком хематома услед оштећења крвних судова и регрутовањем великог броја инфламаторних ћелија (макрофага, моноцита, лимфоцита, неутрофила) (Sfeir и сар., 2005; Marsell и Einhorn, 2011), као одговор на некротични материјал на месту прелома (Cguess и сар., 1985). Проинфламаторни цитокини који су секретовани у овој фази зарастања кости стимулативно делују на процес регенерације уколико је њихова секреција краткотрајна и контролисана (Gerstenfeld и сар., 2003). У супротном, хронична експресија доводи до оштећења екстрацелуларног матрикса и настанка фиброзе.



Слика 2. Фазе регенерације кости (Преузето и модификовано из извора: [http://bioserv.fiu.edu/~walterm/Fund\\_Sp2004/musc\\_skel/Export%20Folder/f6-8\\_bone\\_repair\\_c.jpg](http://bioserv.fiu.edu/~walterm/Fund_Sp2004/musc_skel/Export%20Folder/f6-8_bone_repair_c.jpg))

Резултат инфламаторне фазе је настанак гранулационог ткива на периферији, богатог крвним судовима и фибробластима који синтетишу екстраћелијски матрикс.

Инвазијом плурипотентних мезенхимских стем ћелија из периоста и костне сржи започиње фаза репарације кости која траје неколико недеља. Током репарације настаје спољашњи калус око места фрактуре активношћу хондробласта и остеобласта из камбијалног слоја периоста и циљ му је да обезбеди механичку чврстину месту прелома. Најранија кост у месту прелома настаје активношћу ћелија камбијалног слоја периоста. Унутрашњи калус спаја унутрашње крајеве прекинуте кости (Ctess и сар., 1985) и током времена се уједињује са спољашњим. У раној фази регенерације, калус је претежно изграђен из фибро-хрскавице и незреле (вртложне) кости. Мекан, хрскавичав калус, се постепено замењује незрелом кости у процесу ендохондралне осификације (Sfeir и сар., 2005).

Након спајања прекинутих крајева започиње фаза ремоделације, заменом вртложне кости ламеларном, при чему се ресорбује вишак створеног калуса. Током дужег временског периода долази до постепене модификације региона прелома под утицајем механичког оптерећења чиме се постиже коначна стабилност преломљеног места (Sfeir и сар., 2005).

Процес зарастања кости у остеопоротичним условима пролази кроз све фазе карактеристичне за процес регенерације здраве кости с тим што се ове фазе одликују дужим трајањем (Lopez и сар., 2003). Као и код здравих индивидуа, регенерација кости зависи од биомеханичких и молекуларних фактора као и од ћелија које учествују у репарацији (Kyllönen и сар., 2015). До разлика у процесу зарастања код остеопорозних индивидуа долази услед нарушеног баланса између процеса ресорпције и процеса формирања кости, као и повећане експресије проинфламаторних цитокина која може да угрози формирање калуса и продужи време потребно за регенерацију (Kyllönen и сар., 2015).

Слабија способност регенерације кости у остеопорози је показана у предклиничким студијама код оваријектомисаних модела животиња док се показало да то није увек случај у клиничкој пракси. Када су у питању студије на људима, информације о процесу регенерације остеопоротичне кости су оскудне и подељене. Кашњење процеса формирања калуса које је забележено код свих оваријектомисаних животиња, није увек документовано у клиничким студијама, мада, постоје и студије које указују на одложено зарастање прелома у остеопорози код људи (Nikolaou и сар., 2009; Nikolaou и сар., 2010).

Смањен капацитет регенерације се у клиничким студијама врло често огледа у лошој осеоинтеграцији и повећаном броју неуспелих фиксација прелома (Bargios и сар., 1993; Strømsøe, 2004). Иако неке студије указују на непостојање разлика између здравих и остеопоротичних пацијената (Goldhahn и сар., 2008; Mellado-Valero и сар., 2010), ипак се лоша осеоинтеграција имплантата и проблеми са фиксацијом често јављају као проблем у ортопедији и стоматологији и могу да доведу до неуспеле регенерације кости.

За разлику од клиничких студија, истраживања на експерименталним моделима су показала да остеопороза утиче како на процес зарастања фрактура тако и на процес осеоинтеграције имплантата који се може побољшати коришћењем различитих третмана. У литератури се могу наћи бројни докази о измењеном процесу зарастања прелома и дефеката код оваријектомисаних модела при чему је показано да остеопороза утиче на све стадијуме регенерације кости (Namkung-Matthai и сар., 2001; Wang и сар., 2005). Рани период зарастања остеопоротичних фрактура се карактерише одложеним формирањем калуса који се састоји из мале количине зреле кости (Namkung-Matthai и

сар., 2001). Новонастали калус показује ниску минералну густину, висок садржај делова богатих „меким ткивом“ и смањен број остеобласта који експримирају трансформишући фактор раста- $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) који је неопходан у процесу зарастања кости. Ове карактеристике калуса указују на смањен квалитет регенерације у остеопорози (Ху и сар., 2003; Estai и сар., 2011).

Карактеристике калуса у каснијем периоду регенерације кости, забележене у студијама на оваријектомисаним животињама, су ниска коштана густина, одложена ендохондрална осификација, висока активност остеокласта и присуство слабо организованих, неправилно распоређених новоформираних трабекула (Qiao и сар., 2005; Wang и сар., 2005). Новоформирана кост у каснијем периоду зарастања показује и хистолошке остеопоротичне промене (Kubo и сар., 1999) као и јасно изражену граничну линију прелома за разлику од интактних животиња (Qiao и сар., 2005).

### **1.2.1. Третман остеопоротичних фрактура**

Како би се побољшао исход процеса зарастања прелома у остеопорози, неопходно је применити адекватну терапију која би ојачала место фрактуре и поспешила процес регенерације.

Третман који се користи за лечење остеопорозе може бити користан део третмана и у лечењу остеопоротичних фрактура али је познавање ефеката анти-остеопоротичних лекова на процес зарастања фрактура пресудно у њиховом одабиру током процеса регенерације. С друге стране, различити имплантати су дизајнирани како би побољшали процес фиксације и регенерације кости с тим што је успешност њихове примене у остеопоротичној кости мања него у здравој кости.

#### **1.2.1.1. Анти-остеопоротична терапија и зарастање фрактура**

Већина студија која се бави проблематиком остеопорозе се углавном фокусира на проналажење терапије за превенцију саме болести која би уједно и смањила ризик за настанак остеопоротичних прелома. Иако се смањује стопа настанка фрактура, ипак није честа и њихова појава током третмана. Познавање утицаја лекова који се користе у

третману остеопорозе на процес зарастања фрактура је од велике важности за одабир адекватне терапије која би допринела њиховом зацељењу (Johnson-Lynn и сар., 2008; Goldhahn и сар., 2010; Lyritis, 2010; Giannotti и сар., 2013).

Лекови који се користе у терапији остеопорозе се према свом ефекту на ремоделацију класификују у две групе: анти-катаболички и анаболички лекови (Riggs и Parfitt, 2005). Крајњи ефекат обе групе лекова је повећање чврстине кости али се механизми њиховог деловања на кост разликују.

Анти-катаболички лекови смањују коштани промет а тиме и број ремоделационих јединица у кости и на тај начин доприносе очувању микроархитектуре и чврстине кости. Један део анти-катаболичких лекова супримира и процес ресорпције и процес формирања кости, док постоје и лекови из ове групе који могу позитивно да модулишу фазу формирања кости. Анаболички лекови делују тако што повећавају коштани промет и број ремоделационих јединица, истовремено померајући баланс у овим местима ремоделације у корист изградње кости. На овај начин анаболички лекови доводе до повећања коштане масе што доприноси чврстине калуса (Riggs и Parfitt, 2005).

Највећи број лекова дизајнираних за третман остеопорозе су анти-катаболичког типа. С обзиром да доводе до супресије ресорпције кости, која је саставни део процеса ремоделирања, треба имати у виду да коришћењем ових лекова за време зарастања прелома може доћи до измењеног процеса регенерације. С друге стране, очекивано је да анаболички лекови, који такође могу бити актуелни третман у моменту настанка фрактура, могу да унапреде процес регенерације кости.

Ефекти анти-остеопоротичних лекова на процес зарастања фрактура су углавном испитивани у студијама на животињама и потребне су клиничке студије које би потврдиле добијене резултате. Резултати претклиничких истраживања показују да анти-остеопоротични третмани углавном имају позитиван утицај на зарастање фрактура у остеопорози.

*Бифосфонати.* Бифосфонати су најчешће коришћени лекови у терапији остеопорозе због њиховог јаког инхибиторног дејства на остеокласте и процес ресорпције кости, што је нарочито забележено у условима повећаног коштаног промета (Watkins и сар., 2012). Иако је процес ресорпције кости део сложеног процеса коштаног ремоделирања у коме су остеокласти активни учесници, утицај бифосфоната на процес

зарастања фрактура углавном није инхибиторног типа (Хуе и сар., 2014) осим што се у неким студијама може запазити кашњење фазе ремоделирања. Одложена ремоделација хрскавице у вртложну кост као и вртложне у ламинарну кост, настала под утицајем бифосфоната, се компензује настанком велике количине калуса у месту дефекта (Goodship и сар., 1993; Peter и сар., 1996; Mashiba и Mori, 2009). Amanat и сар. (2005) су испитивали разлике између ефеката системске и локалне апликације бифосфоната на процес зарастања фрактура и установили да системска апликације једне дозе доводи до повећања величине калуса и његове чврстине док локална апликација нема утицаја на чврстину калуса.

У решавању проблема несрастања остеопоротичних фрактура и неуспеле интеграције имплантата у остеопоротичну кост, бифосфонати су показали позитивне ефекте након локалне и системске апликације, уз одложен процес ремоделирања (Hilding и Aspenberg, 2007; Kakar и сар., 2009; Ng и сар., 2014).

На основу постојећих истраживања се може заључити да бифосфонати осим што могу да одложе процес ремоделације калуса немају негативних ефеката на процес зарастања фрактура (Fleisch, 2001). Они доводе до настанка калуса већих размера и могу утицати на повећање чврстине кости и побољшање процеса интеграције имплантата (Einhorn, 2010). Ефекти бифосфоната на регенерацију преломљене кости зависе од избора лека, трајања третмана, начина третмана и примењиване дозе.

*Паратиroidни хормон (PTH).* PTH и витамин Д представљају два главна хормона који учествују у одржавању хомеостазе калцијума и фосфора у организму. Терипаратид (PTH (1-34)) је рекомбинантна форма паратиroidног хормона и први анаболички лек одобрен за третман остеопорозе због значајног утицаја на повећање трабекуларне и кортикалне масе кости (Marcus, 2011). PTH третман код жена са постменопаузом остеопорозом стимулише формирање кости и тиме повећа коштану масу и минералну густину смањујући ризик за настанак фрактура (Sone и сар., 1994; Neer и сар., 2001). Механизам деловања PTH (1-34) још увек није у потпуности разјашњен али је потврђено да његова неконтинуирана администрација утиче на регрутовање и преживљавање остеобласта, повећавајући њихову бројност (Jilka, 2007).

Захваљујући свом анаболичком дејству, овај хормон је моћан кандидат, уз бифосфонате, за решавање проблема зарастања фрактура код пацијената са смањеним капацитетом регенерације (Barnes и Einhorn, 2006; Della Rocca и сар., 2010; Ellegaard и

сар., 2010; Aspenberg, 2013). На основу резултата студија спроведеним на животињама потврђено је да неконтинуирана администрација РТН утиче на процес зарастања фрактура тако што побољшава биомеханичке особине и поспешује стварање калуса (Andreassen и сар., 1999; Holzer и сар., 1999; Andreassen и сар., 2001). Субкутана администрација РТН(1-34) убрзава и унапређује процес зарастања феморалних фрактура и доводи до настанка калуса већих димензија од оног, насталог код нетретираних животиња (Holzer и сар., 1999; Alkhiary и сар., 2005). РТН поспешује процесе ендохондралне осификације и ремоделације калуса (Komatsubara и сар., 2005; Nozaka и сар., 2008; Cirigliano и сар., 2009). Такође се показао ефикасним у раној фиксацији имплантата захваљујући повећању густине околне кости као и контактне површине између ње и имплантата (Skripitz и Aspenberg, 2001).

Када су у питању остеопоротичне фрактуре, тридесетодневна администрација РТН побољшава морфометријске и механичке параметре у дозно зависном маниру (Jahng и Kim, 2000). РТН аналози, након субкутане администрације стимулишу формирање кости, повећавају коштану масу и регулишу баланс калцијума.

Још увек су недовољне клиничке студије које би потврдиле ефикасност РТН у процесу зарастања фрактура код људи (Chalidis и сар., 2007). На основу великог броја студија на животињама где се показао као користан агенс у третману фрактура (Barnes и Einhorn, 2006) као и на основу његове клиничке употребе у својству анаболичког третмана у остеопорози, он се сматра потенцијалним агенсом који би могао да има својство остеогеног „појачивача“ код пацијената са смањеним капацитетом зарастања (Datta, 2011). Нова истраживања се фокусирају на развоју и процени РТН аналога који ће имати улогу у превенцији и третману фрактура код жена са постменопаузном остеопорозом.

*Хормонска супституциона терапија естрогеном.* Недостатак естрогена који доводи до интензивне ресорпције и губитка кости, може се надокнадити коришћењем адекватне супституционе терапије која ублажава симптоме постменопаузне остеопорозе. Терапија замене естрогена је одобрена у постменопаузној остеопорози за превенцију губитка кости и смањење могућности за појаву фрактура (Turner и сар., 1994). Међутим, за коришћење естрогена постоје ограничења због могуће појаве нежељених ефеката.

Естроген и ралоксифен, који се користе као супституциона терапија за недостајући хормон у постменопаузној осеопорози, испитивани су и у процесу зарастања остеопоротичних фрактура код експерименталних животиња. Резултати студија су показали њихов позитиван учинак на формирање калуса и побољшање механичке стабилности кости (Beil и сар., 2010; Kolios и сар., 2010; Stuermer и сар., 2010). Међутим, не постоје докази који би оправдали клиничку употребу ових лекова у зарастању фрактура код људи.

*Витамин Д.* Витамин Д и његови аналози, о којима ће бити речи у даљем тексту, су саставни део сваке остеопоротичне терапије. Њихов ефекат на процес зарастања остеопоротичних фрактура је врло слабо испитиван иако је, поред индиректног утицаја на минерализацију кости, уочен и њихов директан анаболички ефекат на кост (Erben, 2001). У студији *Shiraishi* и сар. (2000) показана је предност алфакалцидола, синтетичког аналога витамина Д, у стимулацији процеса изградње кости у односу на примењену терапију естрогеном. Малобројне студије, које не укључују испитивања на људима, показују да би коришћење витамина Д могло да има корисне ефекте у процесу зарастања фрактура код постменопаузних жена.

Поред поменутих, постоје и други лекови који се користе у терапији остеопорозе и имају мањи или већи утицај на процес зарастања фрактура. Међутим, њихови ефекти на регенерацију кости су слабо испитивани и још увек представљају непознаницу.

#### **1.2.1.2. Локални приступ лечењу фрактура и дефеката у остеопоротичној кости**

Као део третмана остеопоротичних фрактура пожељно је коришћење и заменика кости који би допринели стабилности места прелома и омогућили бољу фиксацију. Уједно, ови биоматеријали који замењују недостајалу кост, могу бити и носачи за различите лекове и факторе раста који би унапредили процес зарастања фрактура и дефеката.

Златни стандард у решавању проблема са несрастањем или закаснелим срастањем, какво се среће у остеопорози, представља коришћење аутографта због својих остеогених, остеоиндуктивних и остеокондуктивних особина (Taylor, 1992; Finkemeier, 2002; Pesce и сар., 2009). Због ограничене доступности аутографта и



компликоване хирушке процедуре његовог добијања, чешће су у употреби алографти и ксенографти, као и синтетички биоматеријали који представљају алтернативу коштаном пресађивању (Finkemeier, 2002; Pesce и сар., 2009). Већина синтетичких биоматеријала је инертна и не поседује остеоиндуктивна и остеокондуктивна својства што отежава њихово насељавање, замену новом кости и осеоинтеграцију. У циљу унапређења зарастања кости често се примењује комбиновање ових биоматеријала 3D структуре (скафолда) са факторима раста, ћелијама или различитим лековима (Khan и сар., 2008; Li и сар., 2008) који служе да индукују формирање коштаног ткива на месту имплантације (Fröhlich и сар., 2008; Howard и сар., 2008; Amini и сар., 2012). Матрице које су израђене од различитих чврстих биокомпатибилних материјала имају важну улогу депоа и носача за испоруку лекова док истовремено могу да служе као скафолди за ћелије и факторе раста у ткивном инжењерству.

Коришћење биоматеријала као носача за анти-остеопоротичне лекове и друге анаболичке агенсе је постао врло популаран приступ у лечењу остеопоротичних фрактура којим се постиже директан утицај третмана на кост и избегавају нежељени ефекти системске апликације (Kyllönen и сар., 2015). Основне особине које ови биоматеријали треба да поседују су биокомпатибилност и биодеградибилност која омогућава постепено ослобађање активних супстанци приликом ресорпције биоматеријала. Локално апликовани лекови доводе до бржег одговора кости на третман и, захваљујући својим остеогеним својствима, директно утичу на повећање чврстине и квалитета кости на месту прелома. Ово је од великог значаја у пракси јер постојање јаче околне кости доприноси мањој стопи неуспелих фиксација имплантата.

Услед недостатка клиничких студија, многе експерименталне студије на животињама су показале позитиван ефекат локалног третмана различитим остеоиндуктивним агенсима. Осим локалне доставе фактора раста која се успешно користи у клиничкој пракси за побољшање процеса регенерације кости и осеоинтеграције имплантата, локална достава осталих потенцијално индуктивних третмана још увек није у клиничкој употреби.

У решавању проблема остеопоротичних прелома, за ефикасност локалног третмана је, поред добро одабраног анаболичког лека, неопходан и добар одабир система за његову доставу. У клиничкој пракси се избор биоматеријала (носача, скафолда) више базира на комерцијалним и клинички доступним материјалима

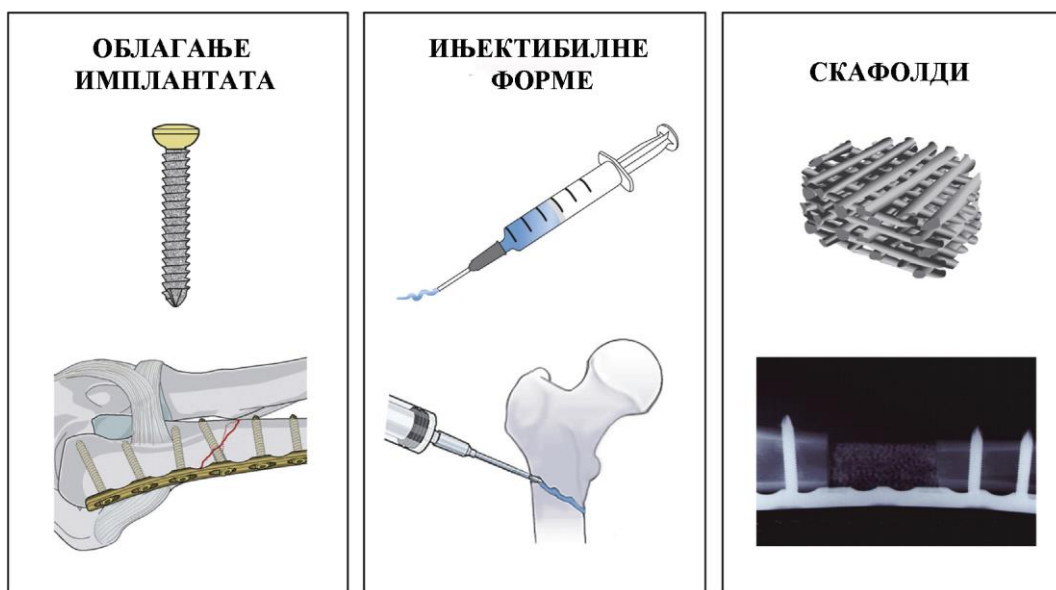
насупротив оним који су у експерименталним истраживањима показали праве карактеристике система за доставу које подразумевају дуготрајно и постепено ослобађање достављеног лека.

Системи за локално допремање и отпуштање лекова се обично класификују према хемијском саставу (керамике, полимери, композити) или према геометрији, односно величини (микрочестице, растресити материјали, хидрогелови) (Kyllönen и сар., 2015)

У припреми локалних система за лечење остеопоротичних фрактура велики проблем представља непознаница апликоване дозе као и профил ослобађања лека. Неки лекови имају супротне ефекте у зависности од апликоване дозе као и континуитета терапије (РТН). Још увек се трага за особинама носача као и профилем ослобађања лека који би допринели бржој регенерацији, интеграцији и механичкој стабилности.

Потенцијалне могућности за локално допремање лекова код остеопоротичних фрактура размотрене су у раду *Kyllönen* и сар. (2015) и укључују облагање имплантата изабраним леком, коришћење инјектибилних форми коштаних цемента и гелова у које се убацује изабрани лек и примену скафолда у случају већих коштаних дефеката (**Слика 3**).

*Цементни материјали базирани на Са и Р* су се показали као одговарајући носачи за лекове због њихове остеокондуктивности која проистиче из сличности са минералном фазом кости, и особине да добро апсорбују и постепено ослобађају анти-ресорптивне агенсе, протеине и мале хидрофобне молекуле (Guo и сар., 2005; van de Watering и сар., 2012; Wu и сар., 2012). Приликом дизајнирања ових система, изабрани лек се инкорпорира у чврсту или течну фазу цемента или у посебне носаче који се затим убацију у место дефекта. Недостатак овог система је потреба за већим простором на месту прелома како би се применила неопходна количина изабраног лека.



**Слика 3.** Начини локалне апликације агенаса коришћених у третману остеопоротичних фрактура и дефеката (преузето и модификовано из извора: (Kyllönen и сар., 2015))

*Облагање имплантата* такође може бити добра стратегија у лечењу остеопоротичних фрактура због могућности достављеног агенса да утиче на осеоинтеграцију имплантата захваљујући свом присуству на његовој површини (Alghamdi и сар., 2014). Метални имплантати, као што је случај титанијумских имплантата, могу бити директно обложени одговарајућим леком док се бољи резултати у третирању фрактура добијају апсорпцијом или инкорпорацијом лека на СаР цементне материјале који се користе као превлака око имплантата (Navarro и сар., 2008). Овакав приступ је омогућио постепено ослобађање коришћеног лека и побољшану осеоинтеграцију имплантата код експерименталних животиња (Sachse и сар., 2005; Yu и сар., 2012). Студије на остеопоротичним моделима животиња које су се бавиле испитивањем утицаја анти-ресорптивних лекова као саставних делова превлака око имплантата су показале да оваква примена доводи до побољшане микроархитектуре кости око места имплантата али није потврђено да ли доприноси и стабилности фрактура (Руо и сар., 2013). Недостаци ове стратегије су могућност ослобађања лека само у близини имплантата, ограничена количина лека коју може да достави имплантат, и отпорност метала на премазивање (Kyllönen и сар., 2015).

У случају већих дефеката у остеопоротичној кости, *скафолди* представљају добар избор за постизање стабилности и могућност за доставу већих количина изабраног лека који је најчешће инкорпоран у партикуле различитих димензија.

*Макро, микро и нано партикуле* представљају врло важне системе за ослобађање различитих агенаса због могућности да саме достављају изабрани лек или да се користе у комбинацији са цементима, када могу бити и саставни део превлаке на имплантатима. У овом случају, изабрани лек се уграђује или абсорбује у партикуле где је заштићен од деградације док не почне његово ослобађање. Кинетика ослобађања примењеног агенса зависи од величине партикула, врсте материјала као и начина припреме система за доставу (Kyllönen и сар., 2015). За коришћење ових партикула битно је познавати фармакокинетику коришћеног лека и сходно томе употребити одговарајући систем партикула за његову доставу.

Партикуле базиране на Са и Р, какве су партикуле хидроксиапатита (НАр), са великом ефикасношћу апсорбују и ослобађају одређене врсте анти-osteoporoticних лекова као што су бифосфонати и фактори раста (Lee и сар., 2011). Хидроксиапатит се такође показао ефикасним у адсорпцији витамина Д (Ozeki и сар., 2008). Као што је већ речено, материјали на бази Са и Р показују сличност са неорганском фазом кости тако да су се показали изузетно остеокондуктивним.

Сви наведени системи су прихватљиви за лечење остеопоротичних фрактура у погледу допремања агенаса и делимичне контроле над њиховим ослобађањем. Даља истраживања би требало да се фокусирају на унапређивању ових особина као и на решавању недостатака који карактеришу сваки од њих појединачно.

Поред система нанопартикула за доставу анаболичких лекова који је још увек у раној фази развоја, будућа истраживања у менаџменту остеопорозе се фокусирају на изради микрочипова и даљинску контролу ослобађања одговарајуће терапије.

### ***1.2.1.3. Коришћење фактора раста у регенерацији остеопоротичне кости***

Фактори раста као што су коштани морфогенетски протеини (енг. *bone morphogenetic protein, BMP*), трансформишући фактор раста- $\beta$  (енг. *transforming growth factor-beta, TGF- $\beta$* ), фактор раста фибробласта (енг. *fibroblast growth factor, FGF*), тромбоцитни фактор раста (енг. *platelet-derived growth factor, PDGF*), и фактор раста

налик инсулину (енг. *insulin-like growth factor*, IGF) су неопходни у свакој фази процеса формирања кости и као такви представљају остеоиндуктивне агенсе који се успешно примењују у процесу зарастања фрактура.

У регенеративној медицини се често користе локално имплантирани или ињектирани фактори раста, појединачно или у комбинацији са биоматеријалима (Mark Fisher и сар., 2013). Комбиновање ових фактора раста са коштаном графтовима и биоматеријалима, који у том случају представљају њихове носаче, доприноси остеоиндуктивности и остеоиндуктивности коришћених биоматеријала, поспешује регенерацију кости и доприноси осеоинтеграцији имплантата у нормалним (Marx и сар., 1998; Wiltsfang и сар., 2004; Xiong и сар., 2015) и остеопоротичним условима (Hollinger и сар., 2008). Оваквим приступом се могу решити многи проблеми који карактеришу процес зарастања остеопоротичних фрактура иако постоје недоумице које захтевају додатна клиничка испитивања (Kyllönen и сар., 2015).

Истраживања су показала да је забележена слабија експресија фактора раста код оваријектомисаних и старијих јединки пацова што утиче на остеоиндуктивни капацитет кости (Cesnjaj и сар., 1991; Yu и сар., 2002). Због свог остеогеног ефекта на мезенхимске ћелије пореклом из остеопоротичне кости (Fromigué и сар., 2004; Pountos и сар., 2010), они се често локално примењују као саставни део терапије остеопоротичних фрактура.

Плазма обogaћена тромбоцитима (PRP) и коштани морфогенетски протеини (BMP) су се у претклиничким и клиничким студијама показали као ефикасна алтернатива аутологним коштаном графтовима (Hagen и сар., 2012; Mark Fisher и сар., 2013).

PRP је аутологни концентрат тромбоцита који након активације ослобађају факторе раста (PDGF, TGF- $\beta$ , VEGF, IGF и EGF) у преломљено место, и на тај начин активирају коштане ћелије и учествују у регенерацији (Marx и сар., 1998). Она се најчешће користи у комбинацији са коштаном графтовима где је показано да PRP промовише регенерацију кости и доприноси осеоинтеграцији имплантата (Marx и сар., 1998; Kim и сар., 2002; Wiltsfang и сар., 2004; Rai и сар., 2007; Bielecki и сар., 2008; Kasten и сар., 2008; Civinini и сар., 2011). Додавањем PRP коштаном графтовима, добија се нови графт, обogaћен факторима раста, који унапређује регенерацију кости.

Када су у питању остеопоротичне фрактуре и дефекти, експерименталне студије су показале да одређене концентрације PRP могу ефективно да побољшају њихово зарастање (Chen L и сар., 2013; Singh и сар., 2014). Третман PRP-ем супресује адипогенезу у костној сржи оваријектомисаних мишева тако што усмерава диференцијацију пре-адипоцита и транс-диференцијацију зрелих адипоцита ка остеогенези (Liu и сар., 2011).

Иако клиничке студије показују добре резултате и залажу се за употребу PRP, већина ових студија је ограничена на приказе појединачних случаја, док постоји само неколико контролисаних клиничких студија које пружају висок ниво медицинских доказа (Dallari и сар., 2007; Bielecki и сар., 2008)

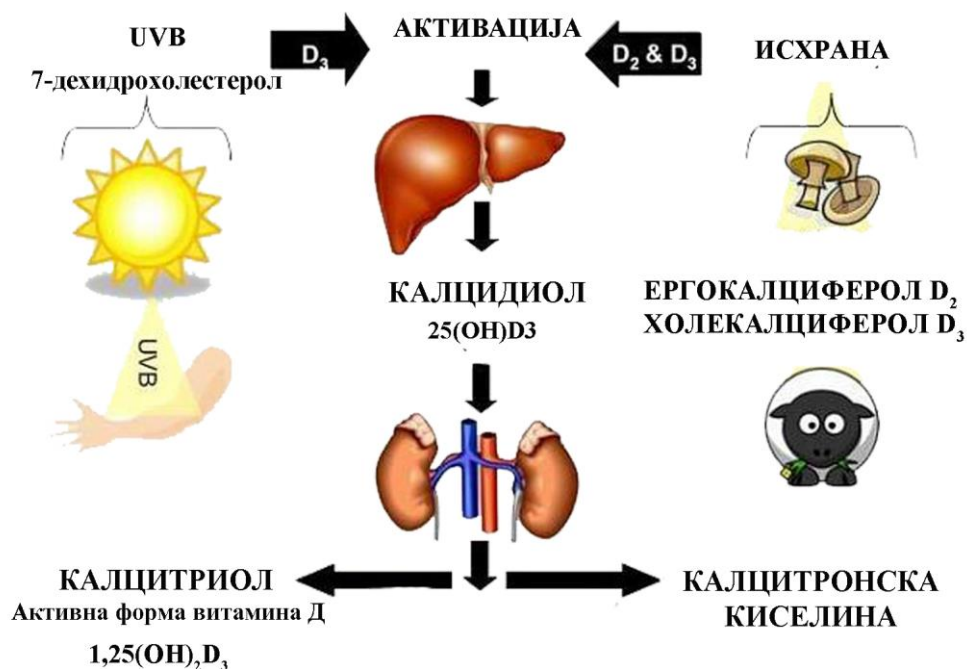
Локално апликовани коштани морфогенетски протеини (BMP-2, BMP-7) имају остеоиндуктивне ефекте и ефикасни су у решавању проблема зарастања фрактура, нарочито када су у питању проблеми са несрастањем (Li и сар., 2010; Mark Fisher и сар., 2013; Park и сар., 2013). Студије су потврдиле њихову ефикасност код остеопоротичних модела животиња док је њихова клиничка употреба и даље контроверзна због одређених недостатака у сигурности и економичности (Kyllönen и сар., 2015).

Поред наведених, и појединачна употреба осталих фактора раста је испитивана у процесу регенерације кости с тим што су истраживања о њиховом утицају на репарацију остеопоротичних дефеката и фрактура оскудна (Khojasteh и сар., 2013). Неки од њих, као што је PDGF, се већ сматрају озбиљним кандидатима за лечење остеопоротичне кости системом локалне доставе. PDGF се већ широко користи у клиничким и претклиничким истраживањима као локално примењен агенс који унапређује регенерацију кости али су његови ефекти слабо испитивани у остеопоротичним условима (Hollinger и сар., 2008).

### 1.3. Витамин Д и његова улога у регенерацији остеопоротичне кости

#### 1.3.1. Витамин Д

Витамин Д је липосолубилни витамин који се синтетише у организму човека али се и уноси у организам преко хране. Главни извор витамина Д код људи је ендогена синтеза у кожи из 7-дехидрохолестерола под утицајем UV-B зрачења (Horst и сар., 2005; Feldman и сар., 2007). Овако настао витамин Д (холекалциферол,  $D_3$ ) представља неактивну форму витамина која захтева додатну активацију у циљу остваривања физиолошког ефекта. Путем хране, витамин Д у организам доспева у форми ергокалциферола ( $D_2$ ) или холекалцифрола ( $D_3$ ) (Слика 4).



Слика 4. Синтеза и активација витамина Д (преузето и модификовано из извора: <http://clinicalpathology.info/vitamin-d-tests-at-a-glance/>)

Након синтезе, витамин  $D_3$  се складишти у масном ткиву или одлази у јетру, где започиње први корак активације. Метаболичка активација витамина  $D$  се остварује двоструком хидроксилацијом у јетри и бубрезима при чему настаје активна форма витамина  $D$  (калцитриол,  $1,25(OH)_2D_3$ ) која стимулише апсорпцију  $Ca$  у цревима и одржава његову хомеостазу организму.

У јетри, под утицајем ензима 25-хидроксилазе (енг. *vitamin D-25 hydroxylase*), неактивна форма витамина  $D$  прелази у калцидиол ( $25(OH)D_3$ ) (Gascon-Barre и Feldman, 1997). Продукција  $25(OH)D_3$  у јетри је слабо физиолошки регулисана и зависи од концентрације супстрата (Horst и сар., 2005). Откривено је да  $1,25(OH)_2D_3$  може бити њен негативан модулатор (Bell и сар., 1984). Присуство екстрахепатичне 25-хидроксилазе је забележено у цревима, бубрегу и у кости (Tucker и сар., 1973), захваљујући чему је омогућена и локална активација синтетичког аналога алфакалцидола ( $1\alpha(OH)D_3$ ) у остеобластима (Ichikawa F, 1995).

Хидроксилација  $25(OH)D_3$  у  $1,25(OH)_2D_3$  се под нормалним физиолошким условима одиграва у бубрезима под утицајем РТН, уз помоћ ензима  $1\alpha$ -хидроксилазе. Мале количине  $1,25(OH)_2D_3$  настају у екстрареналним ткивима, под утицајем цитокина. У одређеним патолошким стањима, екстраренална продукција витамина  $D$  може значајно да допринесе промени хомеостазе калцијума (Hewison и Adams, 2005). Ензим  $1\alpha$ -хидроксилазу поред бубрега поседују и кожа, коштаног ткива, дебело црево, плацента, простата, макрофаги и адипоцити (Weisman и сар., 1979; Howard и сар., 1981; Adams и сар., 1983; Li и сар., 2008). У остеобластима кости, могу се наћи обе хидроксилазе које омогућавају потпуну конверзију  $D_3$  у  $1,25(OH)_2D_3$  и његово локално дејство (Mason и сар., 2013).

Иако су идентичне (Zehnder и сар., 2001), активност реналне и екстрареналне хидроксилазе је различито регулисана. Док је ренална форма искључиво под контролом РТН, при чему зависи од концентрације калцијума и фосфора (Feldman и сар., 2007), екстраренална форма пронађена у макрофагима не подлеже регулационом механизму РТН и фосфата и показује изузетну осетљивост на стероиде (Hewison и Adams, 2005).



### 1.3.2. Физиолошка улога витамина Д

Активна форма витамина Д остварује своје функције у организму преко рецептора за витамин Д (VDR) на циљним ћелијама (Haussler и сар., 1997).

Делујући на танко црево, кост и бубрег, витамин Д игра кључну улогу у одржавању минералне хомеостазе стимулишући ослобађање калцијума у крвоток. Поред тога, калцитриол регулише и многе друге процесе у организму; он инхибира ћелијски раст, промовише диференцијацију ћелија и супримира инфламацију и имунски одговор, захваљујући чему је озбиљан кандидат за лечење многих болести (DeLuca, 2004).

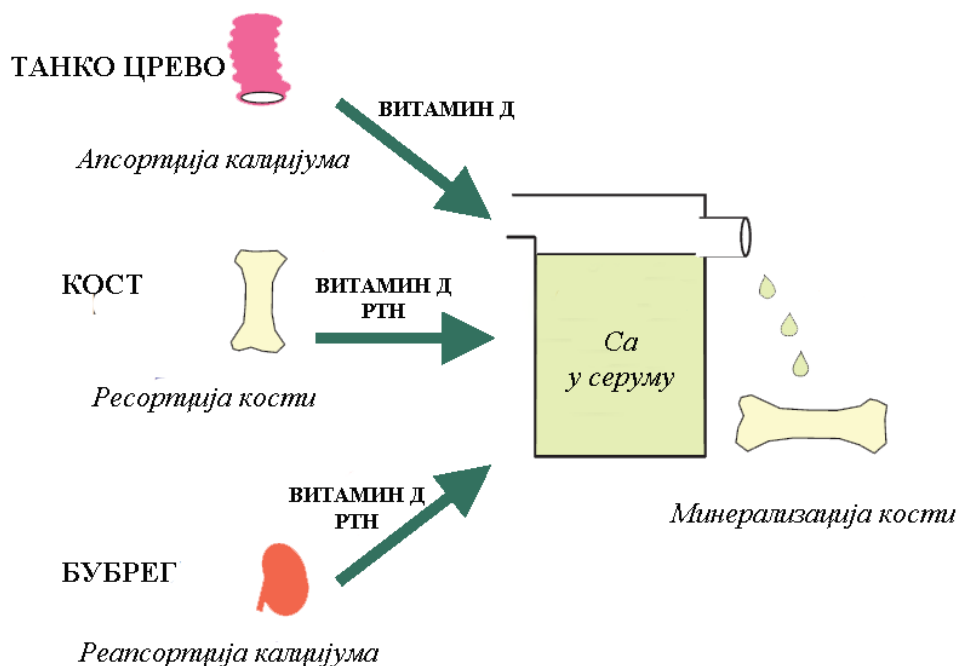
#### 1.3.2.1. Регулација минералне хомеостазе

Главну улогу у одржању хомеостазе калцијума и фосфора у организму има координисана интеракција  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  и РТН који регулишу активност ензима  $1\alpha$ -хидроксилазе у бубрегу (енг. *25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase*) (Jones и сар., 1998; Miyayama и сар., 1999). Витамин Д је једини хормон који стимулише интестиналну апсорпцију калцијума и тиме индиректно доприноси минерализацији кости (Слика 5).

Услед смањене концентрације калцијума у крви долази до повећаног ослобађања РТН који стимулише активност ензима  $1\alpha$ -хидроксилазе у бубрегу и доводи до повећане бубрежне екскреције фосфора. Повећан ниво РТН, заједно са смањеном концентрацијом фосфора, додатно повећава активност  $1\alpha$ -хидроксилазе чиме долази до синтезе  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  из  $25(\text{OH})\text{D}_3$ . Настао  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , остварује своју основну физиолошку функцију у цревима, односно доводи до стимулације интестиналне апсорпције калцијума.

Повећање концентрације калцијума у крви смањује секрецију РТН и даљу продукцију  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  у бубрезима.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  делује на бубрег где супресује експресију гена за  $1\alpha$ -хидроксилазу док стимулише експресију гена за  $24$ -хидроксилазу, чиме се спречава даља синтеза  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  и стимулише инактивација,

продукцијом  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  који се даље катаболише до калцитронске киселине (Jones и сар., 1998), форме која је растворљива у води и излучује се путем урина.



**Слика 5.** Физиолошка улога витамина Д у одржавању хомеостазе калцијума (преузето и модификовано из извора: (Takahashi и сар., 2014))

С друге стране, уколико нема довољно калцијума у исхрани, РТН и  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  заједно делују на кост где подстичу њену разградњу, док утицај РТН на бубрег повећава реапсорпцију калцијума одржавајући на тај начин његову хомеостазу у крви.

Витамин Д је неопходан за нормалну минерализацију скелета и услед његовог недостатка или блокаде његове активације и деловања, долази до појаве рахитиса или остеомалације. Фармаколошка администрација активних форми витамина Д повећава интестиналну апсорпцију калцијума, инхибира секрецију РТН и стимулише реапсорпцију калцијума у бубрегу, што доводи до његове повећане концентрације у крви и смањене мобилизације из кости. Из овога се може видети да је утицај витамина Д на минерализацију кости, последица његовог индиректног ефекта на кост (**Слика 4**) (Weinstein и сар., 1984; Erben, 2001; Eisman и Bouillon, 2014; Takahashi и сар., 2014).

### 1.3.2.2. Директан утицај витамина Д на кост

Витамин Д остварује своје директне ефекте на кост захваљујући присуству VDR рецептора на остеобластима, стромалним ћелијама и раним прекурсорима остеокласта (Narbaitz и сар., 1983; Morris и Anderson, 2010). Он је главни регулатор процеса ресорпције и изградње кости који су део сложеног процеса коштаног ремоделирања.

Калцитриол, делујући на прекурсоре остеобласта, подстиче њихову пролиферацију и диференцијацију у зреле остеобласте и утиче на продукцију колагена типа 1, алкалне фосфатазе и остеокалцина у овим зрелим ћелијама, чија је основна улога синтеза коштаног матрикса (Franceschi и Li, 2011).

Утицај витамина Д на остеокласте може бити индиректан или директан. Индиректан утицај на остеокласте, витамин Д остварује преко VDR рецептора на остеобластима, уз учешће RANKL/RANK/OPG система (Suda и сар., 1999). Директан утицај на остеокласте је омогућен преко VDR рецептора на прекурсорима остеокласта, чиме се спречава њихова диференцијација у зреле ћелије које разграђују кост (Takasu и сар., 2006)

Ефекат витамина Д на остеокласте зависи и од степена диференцијације остеобласта. *In vitro* истраживања показују да витамин Д стимулише ресорпцију кости (Raisz и сар., 1972) индукујући експресију RANKL молекула на незрелим остеобластима/стромалним ћелијама чиме доводи до остеокластогенезе и настанка зрелих, мултинуклеарних остеокласта (Kitazawa и Kitazawa, 2002; Suda и сар., 2012). Међутим, деловање витамина Д на зреле остеобласте, с друге стране доводи до инхибиције ресорпције кости преко повећане експресије OPG, што је такође доказано у *in vitro* условима (Baldock и сар., 2006).

У *in vivo* истраживањима, забележена је смањена експресија RANKL на зрелим остеобластима миша након администрације витамин Д аналога (Harada и сар., 2012). Пошто се претпоставља да од степена диференцијације остеобласта зависи и њихова RANKL експресија, у студији Takahashi и сар. (2014) је објашњено да витамин Д делује тако што утиче на диференцијацију незрелих у зреле остеобласте који се карактеришу слабијим нивоом експресије RANKL молекула. Такође, утицај витамина Д на хомеостазу калцијума може последично да доведе до смањене експресије RANKL и супресије ресорпције кости (Takahashi и сар., 2014),

Директан ефекат активних форми витамина Д на прекурсоре остеокласта је забележен у условима повећаног коштаног промета какви се срећу у остеопорози и огледа се у инхибицији остеокластогенезе која је стимулисана RANKL молекулом са остеобласта. Делујући директно на остеокласте,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  супримира експресију *c-Fos* протеина који представља неопходан транскрипциони фактор остеокластогенезе (Takasu и сар., 2006). Овом у прилог иде и истраживање Shibata и сар. (2002) који су показали да витамин Д инхибира остеокласогенезу *in vivo*, смањујући број прекурсора остеокласта у костној сржи овариектомисаних мишева.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  стимулише и експресију интерферона  $\beta$  (IFN- $\beta$ ), који је инхибитор остеокластогенезе у прекурсорима остеокласта (Sakai и сар., 2009). Поменути ефекти активних форми витамина Д на супресију ресорпције кости су забележени администрацијом високих доза овог витамина,  $>10^{-9}$  М, које доводе до појаве хиперкалцемије код експерименталних животиња.

Ефекат витамина Д на процес формирања кости зависи од примењене дозе витмина и заснован је на директном утицају његових активних форми на остеобласте. Администрација ниских доза витамина Д не утиче на изградњу кости код овариектомисаних пацова, док високе дозе повећавају стопу изградње (Erben, 2001). Након краткотрајног третмана високим дозама калцитриола, долази до повећања броја прекурсора остеобласта у костној сржи и повећане синтезе коштаног матрикса (Erben, 2001).

### 1.3.3. Витамин Д и имунски систем

Захваљујући присуству VDR на ћелијама имунског система, дошло се до сазнања да  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  може бити и потенцијални имуномодулаторни агенс (Deluca и Santona, 2001; Aranow, 2011). Витамин Д остварује своје ефекте на већину ћелија имунског система међу којима су макрофаги (Provvedini и сар., 1983) и дендритске ћелије (Brennan и сар., 1987), које спадају у антиген презентујуће ћелије (APC),  $\text{CD4}^+$  и  $\text{CD8}^+$  Т лимфоцити (Veldman и сар., 2000) и В лимфоцити (Lemire и сар., 1984).

Активне, хормоналне форме витамина Д инхибирају пролиферацију и диференцијацију В ћелија и спречавају секрецију антитела (Lemire и сар., 1984).

Показано је да њихова администрација инхибира пролиферацију Т лимфоцита, док преко директног утицаја на наивне CD4<sup>+</sup> Т ћелије подстиче развој одговора помоћничких Т ћелија (енг. *T-helper cells*, Th) типа 2 (Th2 одговор) (Overbergh и сар., 2000). Витамин Д супримира инфламаторне Th17 ћелије (Tang и сар., 2009) и подстиче развој регулаторних Т ћелија (Gregori и сар., 2001). Услед оваквих ефеката, он доводи до смањене продукције инфламаторних цитокина (IL-17, IL-21), док са друге стране повећава продукцију анти-инфламаторних цитокина (IL-10).

Захваљујући постојању VDR рецептора на моноцитима и дендритским ћелијама, витамин Д инхибира продукцију про-инфламаторних цитокина од стране моноцита (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 and TNF $\alpha$ )(Almerighi и сар., 2009) и спречава диференцијацију и сазревање дендритских ћелија уз очување њиховог незрелог фенотипа (Piemonti и сар., 2000). Настанак толерогених дендритских ћелија (Széles и сар., 2009) доводи до повећања броја регулаторних Т ћелија, што доприноси развоју ауто толеранције, спречава развој аутоимуности и онемогућава одбацивање алографта (Lemire и Archer, 1991; Hullett и сар., 1998; Gregori и сар., 2001).

С обзиром на дефицијенцију витамина Д у аутоимунским болестима, као и могућност ћелија имунског система да одговоре на терапију истим, суплементација витамином Д у оваквим стањима је још једна значајна терапеутска улога овог витамина. Због могућег хиперкалцемијског ефекта као ограничења у системској администрацији витамина Д, синтетисано је неколико нискокалцемијских аналога витамина Д са специфичним особинама усмереним ка превенцији аутоимунских болести и спречавању одбацивања алографта (Mathieu и сар., 1995; Larsson и сар., 1998; Verstuyf и сар., 2000; Mathieu и Adorini, 2002)

#### 1.3.4. Витамин Д и остеопороза

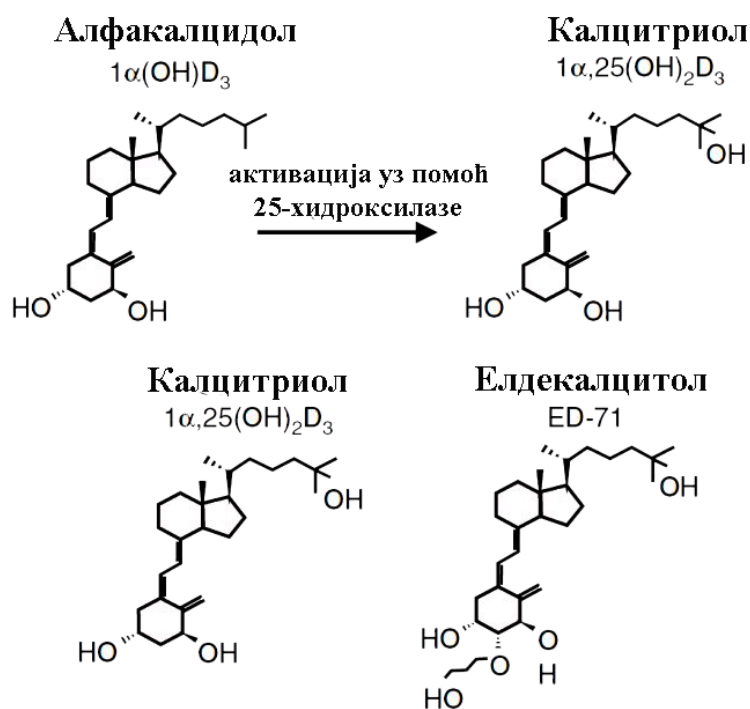
Витамин Д и калцијум су неопходни агенси у превенцији и третману остеопорозе. Код постменопаузних жена са повећаним ризиком од развоја ове болести, витамин Д и калцијум могу бити адекватна терапија која уједно смањује и ризик за настанак фрактура (Jackson и сар., 2006). Особе са већ потврђеном болешћу, уз витамин Д и калцијум захтевају и употребу јаче анти-ресорптивне терапије која се

користи за лечење већ узнатредовале болести. Многи од лекова који се користе у лечењу остеопорозе, првенствено бифосфонати, су слабо ефикасни код пацијената са дефицијенцијом витамина Д, тако да је његова употреба неопходан део терапије (Lips и сар., 2010).

Третман обичним витамином Д (холекалциферол, Д<sub>3</sub>) је ефикасан само у случају његове смањене концентрације у организму и нормалног функционисања бубрега који представљају место његове активације (Lau и Baylink, 1999; Nordin и сар., 1999). Међутим, постменопаузна остеопороза није увек повезана са дефицијенцијом витамина Д чиме је онемогућена активација холекалциферола у активну форму, односно калцитриол. Пошто хидроксилсане форме витамина Д не захтевају активацију и њихова активност не подлеже негативном регулационом механизму 1 $\alpha$ -хидроксилазе, њихово коришћење у случају довољне концентрације витамина Д је неопходно у циљу постизања жељених ефеката (Nordin и сар., 1999).

Активне форме витамина Д, калцитриол (1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), алфакалцидол (1 $\alpha$ (OH)D<sub>3</sub>) и елдекалцитол (1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-2b-(3-hydroxypropoxy)D<sub>3</sub>) се користе у терапији остеопорозе јер је показано да повећавају минералну густину кости и смањују ризик од настанка фрактура код остеопоротичних пацијента (Gallagher и Goldgar, 1990; Tilyard и сар., 1992; Orimo и сар., 1994; Matsumoto и сар., 2011) (Слика 6).

Због могућности деловања у пуној дози као и плејотропних ефеката на метаболизам калцијума, коштаног ткиво, мишићно ткиво и друге циљне органе, калцитриол и његови аналози су показали предност у очувању густине кости и већи допринос њеној чврстости у односу на холекалциферол (Lau и Baylink, 1999; Ringe и Schacht, 2004; Bouillon и Reid, 2008).



**Слика 6.** Структура активних форми витамина Д које се користе у третману остеопорозе (преузето и модификовано из извора: (Takahashi и сар., 2014)

Поред супресије РТН, која представља главни механизам анти-ресорптивних ефеката активних форми витамина Д, и директан, аутокрини/паракрини утицај витамина Д на кост је од велике важности за спречавање разградње кости као и стимулацију њене изградње. Као што је већ поменуто, системска администрација високих доза калцитриола код пацова, поред смањења ресорпције кости, доводи до стимулације процеса формирања кости, његовим директним утицајем на остеобласте (Erben и сар., 1997). Администрација високих доза доводи до повећања коштане масе и биомеханичке чврстине кости (Erben, 2001; Erben и сар., 2002).

Међутим, коришћење ових високих доза калцитриола доводи до појаве хиперкалцемије, хиперкалцурије и настанка камена у бубрегу чиме је ограничена његова терапеутска употреба. Како би се избегла терапеутска ограничења настали су многи синтетички аналози витамина Д са редукованом калцемијском активношћу који су допринели његовом повећаном терапеутским потенцијалу и данас се успешно

користе у лечењу остеопорозе, псоријазе, и хроничних бубрежних болести са секундарним хиперпаратиреоидизмом (Jones, 2012).

Најћешће коришћени аналог витамина Д у терапији остеопорозе је алфакалцидол ( $1,\alpha(\text{OH})_2\text{D}_3$ ). Он представља синтетички прекурсор  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  и биолошки је активан тек након хидроксилације у јетри или другим ћелијама које поседују ензим 25-хидроксилазу, међу којима су и остеобласти (Ichikawa F, 1995). Његова постепена хидроксилација не доводи до наглог повећања концентрације калцијума у крви (Lau и Baylink, 1999) и тиме смањује могућност појаве хиперкалцемије која се код терапије калцитриолом јавља убрзо након администрације. Показано је да су акумулација и полуживот хормоналне форме витамина Д у костима већи након терапије алфакалциолом односу на терапију калцитриолом (Dambacher и Schacht, 1996; Ringe и Schacht, 2004).

У остеопоротичним условима, примена алафакцидола је показала предност у очувању коштане масе у поређењу са деловањем холекалциферола и калцитриола (Shiraishi и сар., 1999; Ringe и Schacht, 2004). Поред својих ефеката на супресију процеса ресорпције кости, алфакалцидол стимулише формирање кости својим директним утицајем на остеобласте (Shiraishi и сар., 2000).

Истраживања на оваријектомисаним пацовима су показала да алфакалцидол повећава кортикалну и спонгиозну коштану масу, побољшава квалитет и механичке особине кости, повећава мишићну снагу и смањује ризик од настанка фрактура (Aerssens и сар., 1996; Bischoff и сар., 1999; Scharla и сар., 2003; Ringe и Schacht, 2004; Iwamoto и сар., 2006; Saito и сар., 2010).

Смањујући ресорпцију кости, он супримира убрзан коштани промет код старијих жена са остеопорозом, који представља главни показатељ настанка прелома током ове болести (Shiraki и сар., 2004). Захваљујући оваквим ефектима, алфакалцидол је ефикасан агенс у превенцији и лечењу свих типова остеопорозе, укључујући и постменопаузну остеопорозу.

У клиничким студијама је показано да свакодневна администрација елдекалцитолоа повећава ВМД лумбалног дела кичме и кука (Matsumoto и сар., 2005) и смањује могућност настанка фрактура код остеопоротичних пацијената (Matsumoto и сар., 2011). Елдекалцитол остварује јачи супресорни ефекат на ресорпцију кости од



алфакалцидола уз сличне ефекте на процес изградње кости и екскрецију калцијума (Matsumoto и сар., 2010). Истраживања на оваријектомисаним моделима животиња су показала да овај агенс супресује RANKL молекул на остеобластима, смањује ресорпцију и стимулише фокално формирање кости, већим интензитетом од калцитриола (Harada и сар., 2012; Saito и сар., 2013).

До сада је развијено више аналога витамина Д са анаболичком функцијом и супресивним ефектом на процес разградње кости. Искоришћавање анаболичких ефеката ових аналога у клиничкој медицини захтева проналажење слабокалцемијских аналога који су специфични за кост, са циљем да се избегну негативни ефекти системске администрације коришћењем високих доза (Erben, 2001).

### **1.3.5. Преглед досадашњих сазнања о утицају витамина Д на процес зарастања остеопоротичних фрактура и дефеката**

Процес зарастања фрактура у остеопорози је отежан због смањеног биолошког капацитета и квалитета остеопоротичне кости. Карактеристике зарастања фрактура и дефеката у остеопоротичној кости су одложена регенерација и проблеми са фиксацијом фрактура и имплантата. Такође, новонастали калус се одликује лоше организованим колагеним фибрилама, одложеном ендохондралном осификацијом, смањеном минералном густином и небалансираном ремоделацијом што компромитује његову чврстину и чини зарасли део кости подложним даљим преломима (Dai и Нао, 2007).

Витамин Д има врло значајну улогу у процесу формирања кости. Његов недостатак негативно утиче на формирање кости због смањене интестиналне апсорпције калцијума неопходног за процес минерализације насталог остеоида. Услед смањене количине овог витамина долази до промена у броју и активности остеокласта и остеобласта што доводи до промена у коштаном ткиву (Rodriguez и Gromelski, 2013). Код 68% тестираних пацијената са закаснелим и непотпуним срастањем забележено је присуство дефицијенције витамина Д (Brinker и сар., 2007).

*Jingushi* и сар. (1998) су показали да долази до смањења концентрације витамина Д у плазми пацова, 3-10 дана након настанка фрактуре. С обзиром на присуство VDR на остеобластима и хондроцитима који започињу процес формирања

калуса, смањена концентрација витамина Д у плазми је објашњена његовом појачаном мобилизацијом на месту прелома где активно учествује у процесу регенерације. *Gorter* и сар. (2014) су показали да витамин Д има улогу у све четири фазе формирања калуса преко утицаја на секрецију цитокина и фактора раста, као и директног утицаја на остеобласте и прекурсоре остеокласта (*Brumbaugh* и сар., 1982; *Gorter* и сар., 2014).

Мали је број студија које су се бавиле испитивањем утицаја витамина Д на зарастање фрактура у остеопорози. На основу прегледа досадашње литературе, витамин Д и његови аналози су показали позитиван утицај на зарастање фрактура како код здравих (*Brumbaugh* и сар., 1982; *Delgado-Martínez* и сар., 1998) тако и код оваријектомисаних животиња (*Fu* и сар., 2009; *Saito* и сар., 2010) али не постоји довољно доказа који би у потпуности расветлили овај комплексан процес.

На основу добијених резултата *Fu* и сар. (2009), калцитриол доприноси формирању континуираног калуса изграђеног из зреле вртложне кости, за разлику од контролне групе која показује одложен процес ендохондралне осификације, 6 недеља након фрактуре. Контролне групе животиња показују закаснили процес регенерације 6 и 16 недеља након прелома. Након 16 недеља регенерације, група пацова који су третирани витамином Д показује ремоделирану зрелу кост на месту фрактуре док је у контролној групи пацова калус још увек у процесу ендохондралне осификације.

*Saito* и сар. (2010) су показали да алфакалцидол утиче на квалитет калуса тако што поспешује формирање ламеларне кости повећавајући унакрсно повезивање колагена и успостављање обрасца који одговара оном који се среће у нормалној кости. Иста студија показује и његов допринос механичкој чврстини калуса који је вероватно последица регуларно распоређених колагених фибрила.

За разлику од поменутих студија у којима је ефекат витамина Д у остеопорози испитиван након његове оралне примене, само једна студија се бавила локалном апликацијом и ефектима витамина Д на процес зарастања дефекта. Испитивање је рађено на дефектима у мандибули пацова, у условима остеопорозе изазване глукокортикоидима. Холекалциферол је у овој студији аплициран у место дефекта коришћењем нанопартикула хидроксиапатита и поли-лактид-ко-гликолид (енг. *poly(D,L-lactide-co-glycolide)*, *PLGA*). Резултати су показали позитиван утицај холекалциферола на ангиогенезу, васкуларизацију, остеогенезу и структуру кости.

Као што се може видети на основу оскудне литературе, витамин Д повећава минералну густину кости (BMD), квалитет и микроархитектуру коштаног ткива и супресује ресорпцију кости у остеопоротичним условима. Анаболички ефекат који остварује на кост након третмана високим дозама, могућност локалне активације и директног деловања на ћелије кости, чине витамин Д и његове аналоге потенцијалним агенсима за локални третман остеопоротичних фрактура и дефеката.

## **2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА**

Остеопороза је широко присутна као здравствени проблем чија се тежина између осталог огледа у отежаној регенерацији кости. Санирање остеопоротичне кости представља велики изазов због њеног смањеног биолошког капацитета, проблема са фиксацијом прелома и осеоинтеграцијом имплантата. Место регенерације често остаје подложно поновним фрактурама због слабог квалитета и чврстине новоформираног калуса.

Локални третман остеопоротичне кости се показао ефикасним у решавању неких од наведених проблема. Иако су витамин Д и његови аналози широко коришћени у склопу анти-остеопоротичне терапије, њихови ефекти нису испитивани у условима постеменопаузне остеопорозе након локалне примене у место дефекта. Сходно томе, предмет истраживања докторске дисертације је регенерација остеопоротичне кости под утицајем локално апликованих форми витамина Д, холекалциферола и алфакалцидола, као саставних компоненти имплантата.

Докторска дисертација је заснована на хипотези да холекалциферол и алфакалцидол могу да унапреде процес регенерације дефеката у остеопоротичној кости након њихове локалне примене.

Сходно предмету истраживања и постављеној хипотези, дефинисани су следећи циљеви докторске дисертације:

1. Успостављање и верификација експерименталног модела остеопорозе изазване оваријектомијом женки пацова *Wistar* соја који би био погодан за праћење регенерације дефеката у дисталном делу фемура
2. Испитивање утицаја холекалциферола и алфакалцидола на процес зарастања дефеката у остеопоротичној кости, када су локално апликовани као саставни део имплантата сачињених од партикула минералног матрикса кости и плазме обогаћене тромбоцитима, на следеће начине:
  - процењивањем утицаја холекалциферола и алфакалцидола на процесе остеогенезе, ресорпције имплантата, ремодилирања ткива у дефекту, интеграције калуса насталог у остеопоротичним условима, као и остале

карактеристике коштаног ткива и имплантата током регенерације остеопоротичне кости;

- праћењем регенерације остеопоротичне кости након периода ране и касне фазе зарастања дефеката;
- помоћу хистолошких, имунохистохемијских, хистоморфометријских, биохемијских и скенинг-електрономикроскопских метода;

3. Упоредивање остеогених ефеката локално примењених холекалциферола и алфакалцидола као саставних делова имплантата, као и компарирање добијених резултата са спонтаном регенерацијом остеопоротичне кости и регенерацијом уз помоћ имплантата сачињених само од минералног матрикса кости и плазме обогаћене тромбоцитима.

### **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

### 3.1. Материјал

У овој докторској дисертацији, као носач за плазму обогачену тромбоцитима (PRP) и витамин Д и као скафолд за насељавање ћелија које ће да синтетишу коштани матрикс, коришћен је минерални матрикс кости (ММК) у облику комерцијалног биокомпатибилног биоматеријала на бази хидроксиапатита – *Bio-Oss*® (Geistlich Pharma, Wolhusen, Switzerland). *Bio-Oss*® је у форми микропартикула, величине 0,25 mm до 1 mm. Добијен је депротеинизацијом говеђе кости у алкалном раствору на 300°C, што су услови за ослобађање од органских компоненти кости. Примена *Bio-Oss*®-а је најзаступљенија у стоматологији где се користи за испуњавање дефеката (Schwartz i sar. 2000; Van Steenberghe i sar. 2000).

Форме витамина Д коришћене за третирање дефеката су холекалциферол и алфакалцидол (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Холекалциферол или обичан витамин Д<sub>3</sub> представља нехидроксилисану, неактивну форму витамина Д, док је алфакалцидол аналог витамина Д и представља једноструко хидроксилисану форму која за своју активацију захтева присуство ензима 25-хидроксилазе. Холекалциферол и алфакалцидол су растворени у алкохолу и разблажени стерилним фосфатним пуфером (PBS), према упутствима произвођача.

### 3.2. Експерименталне животиње

У експериментима су коришћени пацови женског пола *Wistar* соја, старости три месеца и масе 180 - 280 грама. Животиње су чуване под стандардним условима уз дванаесточасовни дневно/ноћни циклус, на температури од 22 - 24°C, са неограниченим приступом води и храни. Две недеље пре почетка експеримента пацови су одвојени у посебне кавезе у које су враћани након операције.

Све експерименталне процедуре спроведене на животињама су одобрене од стране Етичког комитета Медицинског факултета у Нишу (број: 01-6481-18) и у складу са Законом о добробити животиња и Правилником о лабораторијским животињама Републике Србије.



### 3.3. Експериментални дизајн

Истраживања рађена у овиру докторске дисертације укључују две различите студије спроведене на различитим групама експерименталних животиња. Прва студија се односила на добијање експерименталног модела остеопорозе на пацовима и његову верификацију, док је у другој студији испитивана регенерација остеопоротичне кости уз помоћ локално примењених холкалциферола и алфакалцидола заједно са ММК и PRP.

#### 3.3.1. Студија 1: Експериментална остеопороза

У циљу добијања и верификовања експерименталне остеопорозе код овариектомисаних пацова *Wistar* соја, 40 женки пацова старих три месеца подељено је у две групе:

1. група овариектомисаних животиња (експериментална група, ОВ)
2. група лажно оперисаних животиња (контролна група, ЛО)

Група овариектомисаних животиња је подразумевала животиње којима је извршено хирушко уклањање јајника како би се добио остеопоротични модел на коме ће се пратити регенерација остеопоротичне кости. Ову групу је чинило двадесет пацова од којих је по пет жртвовано у размацима од месец дана, у оквиру праћеног периода од 4 месеца. Како би се пратиле промене настале услед недостатка главног извора естрогена, животињама су након жртвовања одређивани ендокринолошки и биохемијски параметари из крви и мерена је густина кости у дисталном делу фемура на основу добијених радиолошких снимака.

Група лажно оперисаних животиња је подразумевала животиње истог узраста које су биле изложене читавој оперативној процедури без финалног уклањања оваријума како би се обезбедили исти стресорни услови као и код овариектомисаних пацова. Овим животињама су одмах након отварања перитонеалне дупље мишићи и кожа зашивени и рана је дезинфикована. Лажно оперисане животиње су жртвоване у

истим временским тачкама и подвргнуте су истим анализама као и овариектомисане, како би се поређењем верификовале промене настале у овариектомисаној групи и утврдио временски период који је потребан да се развију остеопоротични услови након хирушког уклањања јајника

Термини жртвовања су били 1, 2, 3 и 4 месеца након урађене овариектомије или лажне операције.

Да би се избегло прекомерно узимање хране које је повезано са овариектомијом као и нагомилавање масног ткива које представља екстрагонадални извор естрогена, животињама је једном недељно мерена телесна маса и количина хране смањена на 20g /24h, што представља измерен дневни унос хране нормалних, неовариектомисаних пацова.

### **3.3.2. Студија 2: Регенерација остеопоротичне кости**

Пошто су претходно утврђени објективни знаци остеопорозе, три месеца након овариектомије, група од четрдесет пацова старости три месеца је овариектомисана и чувана под истим условима и уз исти режим исхране као и пацови у првој студији у циљу добијања експерименталне остеопорозе.

Три месеца након овариектомије животиње су подвргнуте креирању дефеката и подељене су у четири групе од којих су две контролне и две експерименталне групе. У експерименталним групама животиња праћен је локални утицај две различите форме витамина Д (холекалциферола или алфакалцидола) у комбинацији са носачима сачињеним из ММК и PRP на процес зарастања дефеката у фемуру овариектомисаних пацова. У контролним групама животиња праћена је спонтана регенерација дефеката или регенерација уз помоћ носача.

Сваку групу је чинило по 10 животиња од којих је половина жртвована након периода регенерације од две недеље, док је друга половина жртвована након периода регенерације од осам недеља.

**КОНТРОЛНЕ ГРУПЕ:**

1. **Негативна контрола (спонтана регенерација - СР група)** - чине је животиње чији су дефекти остављени да спонтано зарастају
2. **Контрола носача (скафолд група - СЦ група)** - чине је животиње чији су дефекти испуњени имплантатима који се састоје из ММК и PRP (ММК + PRP носач)

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ГРУПЕ (ВИТАМИН Д ГРУПЕ):**

1. **Холекалциферол група (ХЦ група)** – чине је животиње чији су дефекти испуњени имплантатима сачињеним из холекалциферола на ММК + PRP носачима
2. **Алфакалцидол група (АЦ група)** – чине је животиње чији су дефекти испуњени имплантатима сачињеним из алфакалцидола на ММК + PRP носачима

Након завршених имплантација животиње у експерименталним групама су у првих три дана зарастања локално добијале ињекцију сачињену од 200  $\mu$ l раствора алфакалцидола, концентрације  $5 \times 10^{-7}$  М или 200  $\mu$ l раствора холекалциферола, концентрације  $5 \times 10^{-4}$  М, у зависности од групе. Ињекције су апликоване у област дефекта како би се обезбедила висока почетна концентрација витамина на месту регенерације. Контролне групе су локално добијале исту количину физиолошког раствора како би се обезбедили идентични услови третмана као и у експерименталним групама.

### **3.4. Добијање експерименталне остеопорозе методом билатералне овариектомије**

За добијање остеопоротичног модела пацова коришћен је приступ билатералне овариектомије према већ утврђеној методи (Lasota и Danowska-Klonowska, 2004; Park и сар., 2010)

Пацови су анестезирани интраперитонеалном ињекцијом 10% кетамина (0,1 ml на 100 g телесне масе). Причвршћени су вентралном страном за операциони сточић и на оперативним местима је уклоњена длака уз пратећу дезинфекцију раствором повидон јода.

Билатерална овариектомија је изведена тако што су направљена два дорзолатерална реза у нивоу оваријума, лево и десно од кичме. Резови величине 1,5 cm направљени су скалпелом дуж замишљене медијалне линије на најизбоченијем делу леђа. Отварањем перитонеалне дупље, у масном ткиву се указују јајници и дистални део рога материце који су уклоњени заједно са околним масним ткивом како би се спречила могућност реимплантације могућих преосталих делова јајника који би накнадно наставили да обављају своју функцију. У процедури није било неопходно подвезивање рога материце, јер је крварење до кога долази након уклањања јајника минимално и краткотрајно. Мишићи и кожа су зашивени и рана је дезинфикована раствором повидон јода. Оперисане животиње су стављане у одвојне кавезе како би се спречила могућност инфекције.

### **3.5. Модел дефекта у фемуру овариектомисаног пацова**

У добијеном остеопоротичном фемуру направљен је дефект према процедури описаној од стране *Tielinen* и сар. (2001). Животиње су анестезиране према претходно описаној процедури и причвршћене за операциони сточић. У нивоу дисталог дела фемура длака је уклоњена и место је дезинфиковано раствором повидон јода.

Хирушка процедура се састојала од формирања реза дужине 1 cm на кожи и мишићима, изнад кости у којој је направљен дефект. Дефект је направљен латерално, у дисталном делу дијафизе фемура, непосредно уз метафизу оба екстремитета. За креирање дефеката у фемуру коришћена је стоматолошка бургија, пречника 2 mm. Током читаве процедуре место је одржавано влажним коришћењем физиолошког раствора.

Направљени дефекти испуњени су имплантатима карактеристичним за групу, мишићи су пажњиво превучени преко места дефекта и кожа је ушивена хирушким концем. На крају хируршке процедуре, рана је дезинфикована и животиње су враћене у одвојене кавезе како би се спречила могућност инфекције.

### 3.6. Припрема имплантата

#### 3.6.1. Добијање препарата аутологне плазме обогаћене тромбоцитима

За добијање препарата аутологне плазме обогаћене тромбоцитима коришћена је крв узета из репне вене сваког пацова из групе. Препарат је добијен према методи *Intini* и сар. (2007). Однос 4% натријум цитрата који је коришћен као антикоагуланс и узете крви био је 1:4. Након дезинфиковања и загревања репа животиња, крв сваког пацова је канилом сакупљена у посебне епендорфице и центрифугирана на 1000 грм у трајању од 10 минута. Плазма је одвојена у нове епендорфице и поново центрифугирана на 2500 грм у трајању од 10 минута. Након завршеног центрифугирања на дну епрувете се, око исталожених еритроцита, може уочити беличасти ореол који представља тромбоците добијене из периферне крви.

Добијени тромбоцити су ресуспендовани у 20  $\mu$ l супернатанта како би се добила жељена концентрација тромбоцита. Концентрација тромбоцита која је добијена овом методом је око шест пута већа од физиолошке концентрације тромбоцита у крви пацова. *In vitro* истраживања су показала да PRP у шест пута већој концентрацији иницира одговор адултних мезенхимских стем ћелија (Marx, 2004), тако да је ова концентрација сматрана довољном да може да повећа остеоиндуктивност и

остеокондуктивност ММК као скафолда. Овако добијени препаратни PRP-а су одмах коришћени у припреми имплантата за донорног пацова.

### 3.6.2. Композиција имплантата

Имплантати коришћени за попуњавање дефеката фемура пацова су направљени од три компоненте: ММК (комерцијалног *Bio-Oss-a*), аутологног препарата PRP и испитиване форме витамина Д. У имплантату је течни део (PRP + витамин Д) помешан са ММК у односу 1:1, док је однос витамина Д и PRP-а износио 3:1. Концентрација алфакалцидола је износила 2 µg алфакалцидола по маси имплантата у АЦ групи, док је концентрација холекалциферола била 1000x већа и износила је 2 ng холекалциферола по маси имплантата у ХЦ групи. Примењене концентрације витамина се базирају на већ испитиваним високим дозама за које се показало да делују стимулативно на формирање кости (Erben и сар., 1997; Shiraishi и сар., 2000).

Непосредно пре имплантације добијена PRP је активирана калцијум хлоридом у односу 1:1 и пипетирана на претходно измерену количину *Bio-Oss-a* на коју је затим додат раствор витамина Д. Мешавина је остављена пола сата на собној температури како би се PRP и витамини адсорбовали на ММК партикуле и формирао крвни угрушак који олакшава поступак имплантације.

## 3.7. Жртвовање и узимање узорака крви и костију

Након протеклог временског периода карактеристичног за одговарајућу групу, животиње су анестезиране 10% кетаминим и жртвовање је спроведено узимањем максимално могуће количине крви пункцијом леве вентрикуле срца. Крв узета без антикоагуланса у циљу добијања серума је остављена 30 минута на собној температури да коагулише, а затим центрифугирана 10 минута на 1 500 rpm/мин. Добијен серум је аликвотиран и чуван на -80°C за ендокринолошке и биохемијске анализе.

Животињама су након узимања крви одстрањени фемури који су даље чувани и обрађивани у складу са захтевима примењених метода. Фемури су одмах након

узимања снимани на стоматолошком СТ (енг. *Computed tomography*, СТ ) скенеру, а затим су потопљени у одговарајуће фиксативе у складу са захтевима коришћене методе.

### **3.8. Анализа ендокринолошких и биохемијских параметара у серуму пацова**

#### **3.8.1. Одређивање концентрације естрадиола**

Концентрација естрадиола у серуму пацова одређивана је уз помоћ радиоимунолошке методе (*Radioimmunoassay*, RIA), коришћењем комерцијалног кита (*Cisbio Bioassays*, France). Добијене концентрације изражене су у pmol/L.

#### **3.8.2. Одређивање биохемијских маркера коштаног метаболизма (Ca, P, ALP, AP)**

Концентрације калцијума (Ca) и фосфора (P) као и активности ензима алкалне фосфатазе (ALP) и киселе фосфатазе (AP) у серуму, одређиване су спектрофотометријски на аутоматизованом хемијском анализатору (Erba XL-600, Mannheim, Germany). Добијене вредности концентрације калцијума и фосфора изражене су у mmol/L, док су вредности алкалне и киселе фосфатазе изражене у U/L.

### **3.9. Анализа костију методом волуметријске томографије на апарату са конусним снопом**

Фемури животиња су након жртвовања снимљени на стоматолошком 3DCT скенеру (MEDICA 3DCT<sup>®</sup>, Србија) док је обрада слика рађена у MEDICA 3DCT<sup>®</sup> софтверу и MIMICS<sup>®</sup> софтверу (Materialise, Leuven, Belgium) за обраду и реконструкцију 3D медицинских слика.

*MEDICA 3DCT*<sup>®</sup> је уређај за волуметријску томографију са конусним снопом (енг. *Cone Beam Volumetric Tomography*, CBVT) који омогућава израду просторних медицинских снимака састављених од изотропних воксела, ивице 0,3 mm. Добијени радиолошки снимци су у DICOM формату (енг. *Digital Imaging and Communications in Medicine*), резолуције 0,3 mm / 25,4 mm = 84,67 DPI.

За коришћени уређај су предвиђене две врсте калибрације:

1. Геометријска калибрација, којом се обезбеђује тачност реконструкције геометрије сниманог објекта. Врши се помоћу два еталона (фантома), којима се проверава електро-механички склоп уређаја.
2. Калибрација густине, којом се обезбеђује тачност предвиђања густине ткива на основу нивоа сиве боје на СТ снимку. Врши се помоћу два еталона (фантома). Први еталон је дестилована вода. Најпре се према предвиђеном протоколу врши снимање еталона и калибрација уређаја, при чему се добијене вредности густине воде користе као основни параметри при реконструкцији снимака. Други еталон садржи контролне материјале познатих густина. Еталон се снима према предвиђеном протоколу и упоређују се вредности густине на снимку са стварним густинама контролних материјала. Да би уређај био спреман за рад добијене вредности морају бити у предвиђеним толеранцијама.

### **3.9.1. Мерење радиографске густине костију у дисталном делу фемура**

На добијеним радиолошким снимцима, коришћењем унапред дефинисаних граничних вредности густине кости изражених у HU јединицама (енг. *Hounsfield units*), у софтверу *MIMICS*<sup>®</sup> је направљена "маска кости" која представља скуп воксела чија се густина налази унутар задатих граничних вредности. Услед разлика у геомерији снопа рентгенских зрака, HU вредности добијене са CBVT уређаја не могу се поредити са истим, добијеним на медицинском СТ скенеру. Међутим, с обзиром на идентичне услове под којима су узорци снимани, ове релативне вредности омогућавају уочавање промена у густини дисталног дела фемура између група.



Направљена маска кости покрива читав регион фемура, који укључује и кортикалну и спонгиозну кост. Из маске је издвојен волумен од интереса (VOI) у дисталном делу фемура креирањем нове „основне маске“. Волумен од интереса представља део волумена фемура ( $\text{mm}^3$ ) у дисталној метафизи кога чини шест узастопних пресека од по 0,3 mm. Дистална метафиза је део фемура са високим садржајем спонгиозног ткива на коме се најпре уочавају промене настале у остеопорози. Приликом дефинисања VOI водило се рачуна о епифизној плочи раста тако да је дистални део VOI на 1 mm од плоче раста.

Формирањем различитих скупова воксела у оквиру изабраног VOI употребом алата из сегментационог менија програма *MIMICS*<sup>®</sup>, извршена је сегментација кости на волумене кортикалне кости, спонгиозне кости и периосталног дела кости (Hsu и сар., 2014).

Маска у оквиру VOI која садржи спонгиозну кост је добијена уклањањем површинског слоја основне маске дебљине три воксела који одговара кортикалној кости и периосту. Маска у оквиру VOI која садржи кортикалну кост добијена је уклањањем површинског слоја основне маске у дебљини од једног воксела како би се искључио периост и одузимањем маске која обухвата спонгиозну кост. Маска у оквиру VOI која садржи периост добијена је одузимањем маске кортикалне и спонгиозне кости од првобитне, основне маске.

Резолуција коришћеног СВСТ уређаја није довољно висока да би се уочила структура спонгиозне кости као ни порозност кортикалне кости. Због тога су оне представљене једном вредношћу која се односи на целокупни регион који покривају, укључујући шупљине између трабекула и у оквиру кортикане кости. Према томе, рдиографска густина кости (BD) очитана за сваку од направљених маски представља комбиновану густину дефинисаног волумена која садржи кост и меко ткиво. Комбинована густина кости више указује на количину кости у оквиру изабраног волумена него на густину самог коштаног ткива.

За сваки од добијених волумена који су представљени маскама кортикалног, спонгиозног и периостног дела кости, као и за цео волумен од интереса, очитане су вредности радиографске густине (BD):

1. густина читавог VOI који укључује периост, кортикалну кост и спонгиозну кост (tBD);
2. густина дела VOI који заузима кортикална кост (kBD);
3. густина дела VOI који заузима спонгиозна кост (sBD);
4. густина дела VOI који заузима периост (pBD);

### 3.10. Хистолошка анализа

Процедура за обраду ткива коришћена у овој дисертацији је описана од стране *Miao* и *Scutt*-а (2002).

#### 3.10.1. Фиксација

Дистални делови фемура који садрже дефект су након дисекције фиксирани у периодат-лизин-параформалдехид фиксативу (PLP) направљеном према процедури коју су описали *McLean* и *Nakane* (1974).

PLP фиксатив:

- 2% параформалдехид
- 0.075 М лизин
- 0.01 М натријум перјодат

Направљени фиксатив је рН вредности 7,4 и чува се на температури од 4°C

Узорци костију су фиксирани на 4°C у трајању од 24 часа.

#### 3.10.2. Декалцинација

Након фиксације, узорци су испирани у трајању од 12h на температури од 4°C у растворима 0.01 М PBS-а са растућим концентрацијама глицерола (5%, 10% и 15%).

Декалцинација узорака је урађена уз помоћ EDTA-G раствора који садржи глицерол и етилендиаминтетрасирћетну киселину (EDTA, Sigma-Aldrich).

EDTA-G раствор, 100 ml (Mog и сар., 1988)

- 14.5 g EDTA
- 1.25 g NaOH
- 15 ml глицерола
- дестилована вода

Направљен раствор је рН вредности 7,3 и чува се на температури од 4°C.

Декалцинатор је замењен узорцима на сваких недељу дана све до потпуне декалцинације ткива.

### **3.10.3. Испирање узорака**

Узорци су након декалцинације испирани у трајању од 12 сати на 4°C према већ описаној процедури (Bourque и сар., 1993)

- 15% сахароза и 15% глицерол у PBS-у
- 20% сахароза и 10% глицерол у PBS-у
- 20% сахароза и 5% глицерол у PBS-у
- 20% сахароза у PBS-у
- 10% сахароза у PBS-у
- 5% сахароза у PBS-у
- 100% PBS

### **3.10.4. Дехидратација, калупљење и сечење узорака**

Дехидратација узорака је спроведена кроз растуће концентрације етанола (Merck, Germany), при чему је ткиво било потопљено 120 минута у свакој од концентрација (50%, 70%, 95%), док су у 100% етанолу узорци стајали преко ноћи и урађено је више измена раствора наредног дана. Трећег дана, узорци су пребачени у толуол у трајању од 240 минута, а затим су укалупљени у парафинске блокове (тачка топљења парафина 54 - 56°C). На микротому (LKB Bromma HistoRange Microtome 2218) су прављени пресеци дебљине 4 µm који су затим залепљени на плочице и депарафинисани у термостату на 56°C.

Непосредно пре сваког бојења, плочице са пресецима су потопљене у ксилол у трајању од 10 минута након чега је извршена рехидратација кроз опадајуће концентрације етанола (100%, 95%, 70%).

### 3.10.5. Бојење добијених пресека

У циљу процене остеогенезе и карактеристика новонасталог коштаног ткива, пресеци су бојени хематоксилин-еозином (енг. *Hematoxylin and eosin*, HE), трихромним бојењем по *Masson-у* (енг. *Masson' Trichrome*, MT), толуидин плавим (енг. *Toluidine blue*, TB) као и имунохистохемијским техникама. Добијени препарати су анализирани и фотографисани на *Leica* светлосном микроскопу (*Leica*, DC300, Germany).

#### **Бојење хематоксилин-еозином**

Рехидратисани пресеци су бојени *Harris*-овим хематоксилином у трајању од 10 минута, и након испирања у текућој води, бојени су еозином у трајању од 1 минуте. После испирања дестилованом водом, дехидратације и сушења у термостату, узорци су потопљени у ксилол 5 минута након чега су монтирана покривна стакла.

#### **Трихромно бојење по *Masson-у***

Ткивни пресеци су бојени *Weigert*-овим хематоксилином у трајању од 10 минута након чега су испирани дестилованом водом. Бојење је настављено мешавином раствора киселог фуксина и Понсо 2Р раствора у односу 1:2 у трајању од 2 минута. После испирања дестилованом водом, преко пресека је нанета 1% фосфомолибденска киселина, 2 пута по 1 минут, а затим преко ње раствор анилин плавог у трајању од 5 минута. Након испирања дестилованом водом узорци су дехидратисани до апсолутног алкохола, сушени и после потапања у ксилол монтирана су покривна стакла.

#### **Бојење толуидин плавим**

Након што су рехидратисани, ткивни пресеци су бојени 1% раствором толуидин плавог у трајању од 20 минута. После испирања у дестилованој води, извршена је њихова дехидратација потапањем у растуће концентрације етанола закључно са апсолутним алкохолем. Пре монтирања покривних стакала, плочице са пресецима су стајале у ксилолу најмање 5 минута.

### 3.11. Хистоморфометријска анализа

У циљу квантификовања утицаја холекалциферола и алфакалцидола на процесе ресорпције и формирања кости, рађена су хистоморфометријска мерења која дају информацију о количини новоформиране кости у дефекту као и количини нересорбованог биоматеријала. Партикуле ММК су у овој дисертацији коришћене и као средство за процену ресорптивних способности испитиваних форми витамина Д. Хистоморфометријска анализа је рађена на пресецима који су бојени хематоксилин-еозином и снимани на увећању  $\times 50$ . Мерења су изведена коришћењем *NIS-Elements* софтвера, верзије 3.2 (Nikon, Токуо, Јапан). Уз помоћ “*Annotations and Measurements*” алата на пресецима је мерена укупна површина дефекта, укупна површина гранула материјала и укупна површина новоформиране кости у дефекту.

На основу ових параметара, проценат нересорбованог материјала и проценат новоформиране кости су израчунати према једначинама:

**Процент нересорбованог материјала** = (укупна површина гранула материјала /укупна површина дефекта)  $\times 100$

**Процент новоформиране кости** = (укупна површина новоформиране кости /укупна површина дефекта)  $\times 100$ .

### 3.12. Имунохистохемијска анализа

Имунохистохемијско бојење је рађено стрептавидин-биотин методом. Експресија остеопонтин (OP) и остеокалцина (OC) у новоформираној кости је одређивана коришћењем анти-остеопонтин (ab8448, Abscam, USA) и анти-остеокалцин антитела (ab93876, Abscam, USA). За визуализацију је коришћен HRP/DAB детекциони кит (ab64261, Abscam, USA), употребљен према упутствима произвођача.

Коштано ткиво је фиксирано, обрађено и исечено према већ описаној методи коришћеној за прављење хистолошких пресека.

Пресеци су најпре инкубирани са водоник пероксидом (енг. *Hydrogen Peroxide Block*), 10 минута на собној температури, како би се блокирала активност ендogene пероксидазе. Затим следи инкубација у блокирајућем серуму (енг. *Protein Block*), 5 минута на собној температури, како би се спречило неспецифично позадинско бојење.

Инкубација са примарним антителима је спроведена у трајању од једног сата на 37°C при чему су примарна, анти-остеопонтин и анти-остеокалцин, антитела коришћена у разблажењу 1:200 у PBS-у.

Као секундарно антитело коришћено је биотинизовано IgG антитело (енг. *Biotinylated goat anti-rabbit IgG*) које је инкубирано са пресецима 10 минута на собној температури, после чега су пресеци инкубирани са стрептавидин пероксидазом, такође у трајању од 10 минута. Комплекс стрептавидина и пероксидазе се везује за биотин на секундарном антителу.

Инкубацијом са DAB хромогеном и његовим супстратом у трајању од 10 минута (20 µl DAB хромогена у 1 ml DAB супстрата) на собној температури, добијен је обојени сигнал. Сваки корак у процедури је праћен испирањем у фосфатном пуферу.

За контрастирање, коришћен је *Mayer*-ов хематоксилин у трајању од 10 минута након чега су пресеци дехидратисани кроз растуће серије етанола и монтирани коришћењем пермаунт смоле. Пресеци који су служили као негативна контрола третирани су на исти начин са изузетком примарног антитела.

### 3.13. СЕМ анализа

Дистални делови фемура који су одвојени за анализу на скенирајућем електронском микроскопу фиксирани су у 2.5% глутаралдехиду (Sigma-Aldrich, Germany) преко ноћи на 4°C. Пост-фиксација је урађена потапањем узорака у 1% осмијум тетроксид (Sigma-Aldrich, Germany) у трајању од 90 минута на 4°C. Након испирања у *Milloning* пуферу, узорци су дехидратисани у растућим концентрацијама етанола и ацетона при чему су у свакој концентрацији стајали по 10 минута. За сушење узорака коришћена је метода сушења на критичној тачки, након чега су узорци прекривени златом и посматрани на скенирајућем електронском микроскопу (JSM 5300, JEOL, Japan).

### 3.14. Статистичка анализа података

Сви добијени подаци су анализирани коришћењем *SPSS* статистичког софтвера, верзија 17.0 (*SPSS*, Chicago, IL, USA). Сагласност ових података са нормалним законом расподеле испитана је тестом Колмогоров-Смирнова.

За утврђивање статистичке значајности између група коришћен је метод анализе варијанси ANOVA или *Kruskal-Wallis* тест. Компарација између група је извршена употребом теста најмање значајне разлике (*енг. least significant difference, LSD*) или *Mann-Whitney* теста, у зависности од броја мерења по групи као и од тога да ли расподела узорка одговара нормалној расподели. Разлике су разматране као статистички значајне за  $p < 0.05$ .



## **4. РЕЗУЛТАТИ**

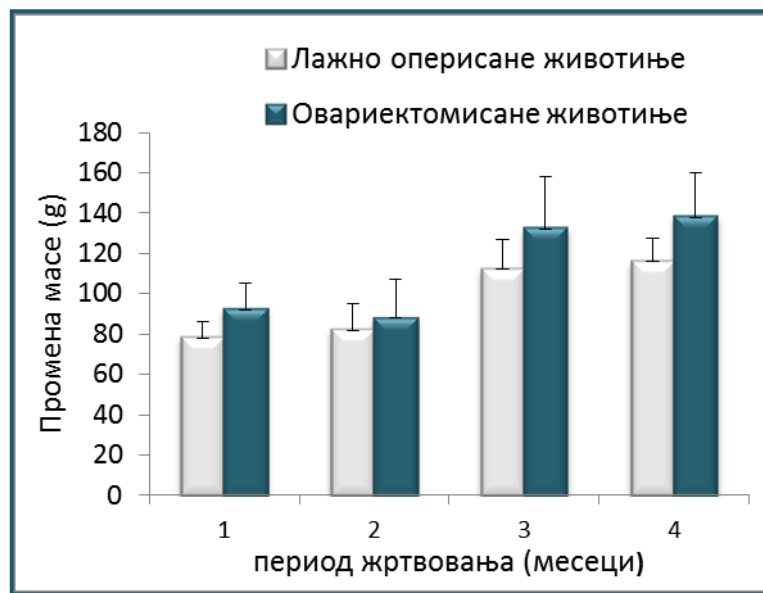
Резултати ове докторске дисертације представљени су у два одељка која су одвојена на основу циљева студија. У првом одељку представљени су резултати студије која се односи на добијање експерименталне остеопорозе на пацовима *Wistar* соја док су у другом одељку приказани резултати студије која се бавила регенерацијом дефеката у остеопоротичном фемуру пацова уз помоћ холекалциферола и алфакалцидола као делова имплантата који се састоје од минералног матрикса кости (ММК) и плазме обogaћене тромбоцитима (PRP).

## **4.1. Експериментална остеопороза**

### **4.1.1. Телесна маса животиња током експерименталног периода**

Како би се искључила могућност екстрагонадалне синтезе естрогена од стране масног ткива, свим оваријектомисаним животињама је након операције контролисана телесна маса и количина унете хране. Промена телесне масе животиња која подразумева разлику између масе животиња у моменту жртвовања и масе измерене на почетку експерименталног периода, у оваријектомисаној и лажно оперисаној групи пацова, приказана је на **Графику 1**.

Као што је дефинисано у експерименталном дизајну, периоди жртвовања лажно оперисаних животиња одговарају периодима жртвовања оваријектомисаних животиња, како би се уочиле евентуалне промене у експерименталној групи након једног, два, три и четири месеца од оваријектомије.



**График 1.** Промена масе овариектомисаних и лажно оперисаних пацова (g) током периода од четири месеца

(Подаци су представљени као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација; Није установљена статистички значајна разлика између група.)

Животиње су постепено добијале на маси током времена и пораст масе у овариектомисаној групи је пратио пораст у одговарајућој контролној групи. Између овариектомисаних и одговарајућих лажно оперисаних животиња не постоје статистички значајне разлике у промени масе ни у једном периоду испитивања.

Животиње жртвоване три и четири месеца након овариектомије показују нешто већи пораст масе у односу на одговарајуће лажно оперисане, али због великих варијација у маси између овариектомисаних јединки, ове промене нису статистички значајне.

#### 4.1.2. Ендокринолошки и биохемијски маркери у серуму пацова

Из серума овариектомисаних и лажно оперисаних пацова су након жртвовања одређиване концентрације естрадиола, калцијума и фосфора и активности ензима алкалне фосфатазе и киселе фосфатазе.

##### 4.1.2.1. Концентрација естрадиола у серуму испитиваних пацова

Концентрација естрадиола у серумима овариектомисаних животиња мерена је током експерименталног периода од четири месеца, на сваких месец дана, након жртвовања одређене групе животиња. Вредности естрадиола мерене су и у групи лажно оперисаних животиња, у истим временским тачкама, након чега су добијене концентрације упоређиване.

На **Графику 2** и у **Табели 1** су представљене концентрације естрадиола у групи овариектомисаних и лажно оперисаних животиња, одакле се може видети кретање естрадиола у оквиру ових група током времена као и разлике у концентрацији између овариектомисних и одговарајућих лажно оперисаних пацова након месец, два, три и четири од операције.

Резултати показују да естрадиол има другачији тренд кретања кроз време у оквиру групе овариектомисаних и групе лажно оперисаних животиња. Након благог, али статистички значајног увећања концентрације естрадиола који је забележен код овариектомисаних животиња жртвованих два месеца од операције, вредност је значајно снижена у трећем месецу, након чега показује благи, али не статистички значајан пораст. Све добијене вредности у оквиру овариектомисане групе се међусобно статистички разликују са изузетком вредности добијених након трећег и четвртог месеца од овариектомије које не показују значајне међусобне разлике.

У групи лажно оперисаних животиња, концентрација естрадиола током испитиваног периода благо расте, али не постоји статистички значајна разлика између добијених вредности у различитим временским тачкама.

**Табела 1.** Концентрација естрадиола (pmol/L) у серуму овариектомисаних и лажно оперисаних пацова током периода од четири месеца

Маркери	Групе	Периоди жртвовања животиња			
		1 месец	2 месеца	3 месеца	4 месеца
Естрадиол	ЛО	7.10 ± 1.34	7.76 ± 1.11	9.18 ± 2.01	8.90 ± 1.88
Естрадиол	ОВ	7.20 ± 3.03	9.54 ± 1.30* <sup>a</sup>	1.72 ± 0.67* <sup>ab</sup>	3.40 ± 0.23* <sup>ab</sup>

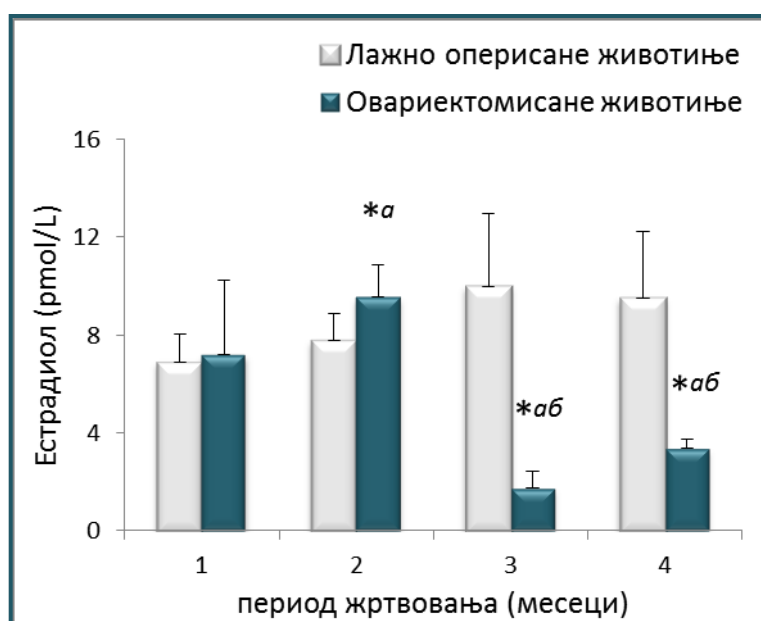
Сви подаци су представљени као средња вредност ± стандардна девијација.

\* Вредности у групи овариектомисаних животиња (ОВ) које показују статистички значајну разлику у поређењу са вредностима одговарајуће групе лажно оперисаних животиња (ЛО), жртвованих након истог временског периода;

<sup>a</sup> вредности у групи овариектомисаних пацова које показују статистички значајну разлику у односу на вредности измерене у првом месецу

<sup>b</sup> вредности у групи овариектомисаних пацова које показују статистички значајну разлику у односу на вредности измерене у другом месецу

Резултати се сматрају статистички значајним у случају \*<sup>ab</sup>P<0.05.



**График 2.** Концентрација естрадиола (pmol/L) у серуму овариектомисаних и лажно оперисаних пацова током периода од четири месеца

(Подаци су представљени као средња вредност ± стандардна девијација;

\* Вредности у групи овариектомисаних животиња које показују статистички значајну разлику у поређењу са вредностима одговарајуће групе лажно оперисаних животиња, жртвованих након истог временског периода;

<sup>a</sup> вредности у групи овариектомисаних пацова које показују статистички значајну разлику у односу на вредности измерене у првом месецу

<sup>b</sup> вредности у групи овариектомисаних пацова које показују статистички значајну разлику у односу на вредности измерене у другом месецу. Резултати се сматрају статистички значајним у случају \*<sup>ab</sup>P<0.05)

Разлике у вредностима естрадиола између овариектомисаих и лажно оперисаних пацова жртвованих након истог временског периода се могу видети из **Табеле 1** и **Графика 2**. Резултати показују да месец дана након овариектомије није добијена статистички значајна разлика у концентрацији естрадиола између групе овариектомисаних и одговарајуће групе лажно оперисаних животиња. Вредност концентрације естрадиола добијена у серумима животиња жртвованих након два месеца од овариектомије се статистички значајно разликује од вредности добијене у одговарајућој групи лажно оперисаних животиња. Резултати показују да је концентрација естрадиола након два месеца порасла у групи овариектомисаних пацова у поређењу са лажно оперисаним пацовима исте старости.

Три месеца након овариектомије забележена је значајно нижа вредност естрадиола код овариектомисаних животиња у поређењу са животињама из одговарајуће контролне групе које су лажно оперисане. Ниска концентрација естрадиола се задржава и четири месеца након овариектомије и добијена вредност је значајно нижа у поређењу са контролном групом животиња исте старости.

#### 4.1.2.2. Биохемијски маркери коштаног метаболизма у серуму испитиваних пацова

Од биохемијских маркера, из крви животиња одређивани су калцијум (Ca), фосфор (P), алкална фосфатаза (ALP) и кисела фосфатаза (AP) како би се утврдиле промене настале у коштаном метаболизму након овариектомије. Добијене вредности приказане су у Табели 2.

**Табела 2.** Биохемијски маркери у серуму овариектомисаних и лажно оперисаних пацова током периода од четири месеца

Маркери	Групе	Периоди жртвовања животиња			
		1 месец	2 месеца	3 месеца	4 месеца
Ca mmol/L	ЛО	2.43 ± 0.10	2.67 ± 0.13	2.67 ± 0.08	2.61 ± 0.07
Ca mmol/L	ОВ	2.46 ± 0.18	2.68 ± 0.16	2.63 ± 0.09	2.31 ± 0.13*
P mmol/L	ЛО	2.83 ± 0.15	2.80 ± 0.35	2.70 ± 0.49	2.81 ± 0.30
P mmol/L	ОВ	3.13 ± 0.09	2.40 ± 0.31*	2.28 ± 0.23*	2.22 ± 0.23*
ALP U/L	ЛО	128.50 ± 14.80	121.40 ± 8.17	108.20 ± 10.70	103.00 ± 20.95
ALP U/L	ОВ	140.80 ± 20.22	158.00 ± 23.03*	125.60 ± 56.29	115.60 ± 17.89
AP U/L	ЛО	16.80 ± 2.86	17.47 ± 1.98	21.87 ± 3.78	17.54 ± 1.81
AP U/L	ОВ	22.80 ± 3.69*	24.77 ± 5.07*	26.13 ± 3.76	20.30 ± 3.01

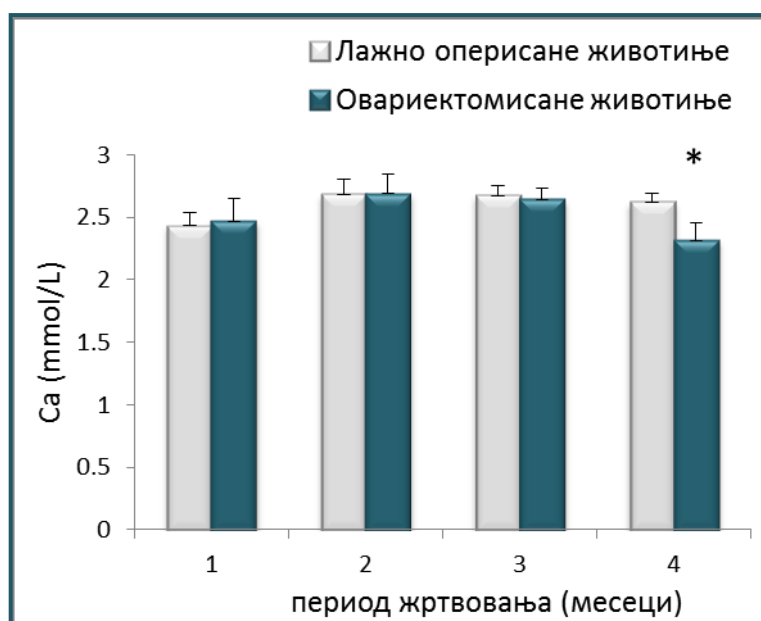
Сви подаци су представљени као средња вредност ± стандардна девијација

\* Вредности у групи овариектомисаних животиња (ОВ) које показују статистички значајну разлику у поређењу са вредностима у одговарајућој групи лажно оперисаних животиња (ЛО), жртвованих након истог временског периода;

Резултати се сматрају статистички значајним у случају \*P<0.05.

### Калцијум

У серумима овариектомисаних животиња одређивана је концентрација калцијума током експерименталног периода и упоређивана са концентрацијама добијеним у серумима лажно оперисаних животиња исте старости. Добијени резултати приказани су на **Графику 3** и у **Табели 2**.



**График 3.** Концентрација калцијума (mmol/L) у серуму овариектомисаних и лажно оперисаних пацова током периода од четири месеца

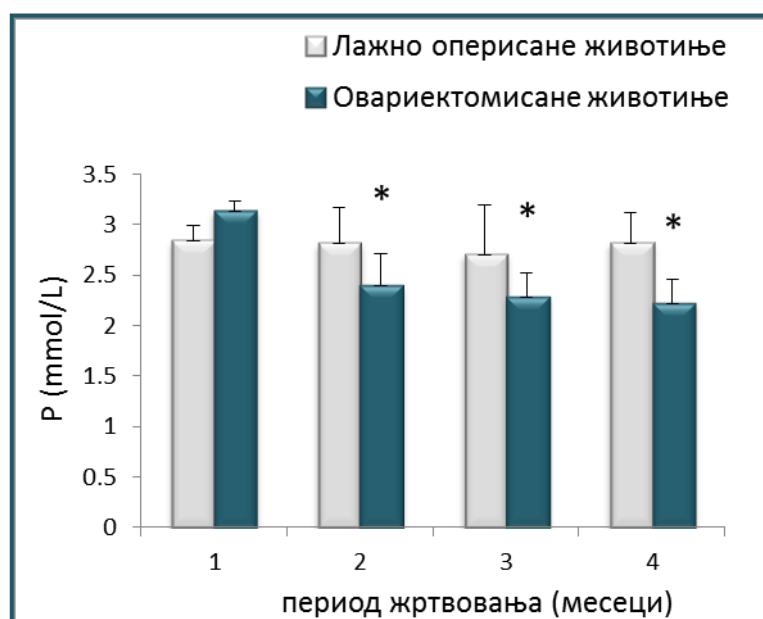
(Подаци су представљени као средња вредност ± стандардна девијација; Резултати се сматрају статистички значајним у случају \*P<0.05)

Резултати показују да је дошло до статистички значајног пада концентрације калцијума у четвртм месецу након операције код овариектомисаних животиња у поређењу са одговарајућом групом лажно оперисаних животиња. Вредности концентрације калцијума након месец, два и три од овариектомије не показују значајну разлику у поређењу са вредностима у одговарајућим контролним групама.



## Фосфор

Из крви овариектомисаних животиња је током експерименталног периода одређивана концентрација фосфора и добијене вредности су упоређиване са концентрацијама фосфора измереним у серумима животиња које су лажно оперисане. Резултати су приказани на **Графику 4** и у **Табели 2**.



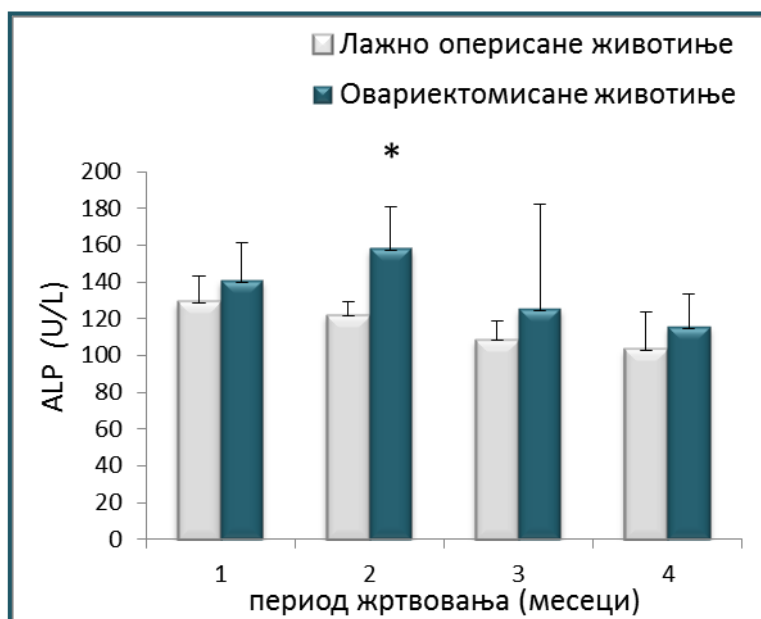
**График 4.** Концентрација фосфора (mmol/L) у серуму овариектомисаних и лажно оперисаних пацова током периода од четири месеца

(Подаци су представљени као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација; Резултати се сматрају статистички значајним у случају  $*P < 0.05$ )

Из **Табеле 2** се може видети да фосфор показује већу осетљивост на овариектомију у односу на калцијум. Концентрација фосфора измерена у серумима животиња из групе овариектомисаних пацова је током посматраног периода статистички значајно нижа од концентрација измерених код одговарајућих лажно оперисаних пацова, са изузетком првог месеца у коме је концентрација фосфора нешто виша али разлика није статистички значајна у односу на одговарајућу контролу.

### Алкална фосфатаза

Активност ензима алкалне фосфатазе, која представља маркер изградње кости, одређивана је у серуму овариектомисаних пацова током посматраног периода и њене вредности су упоређиване са вредностима добијеним код лажно оперисаних пацова, жртвованих у истом термину. Резултати су приказани на **Графику 5** и у **Табели 2**.



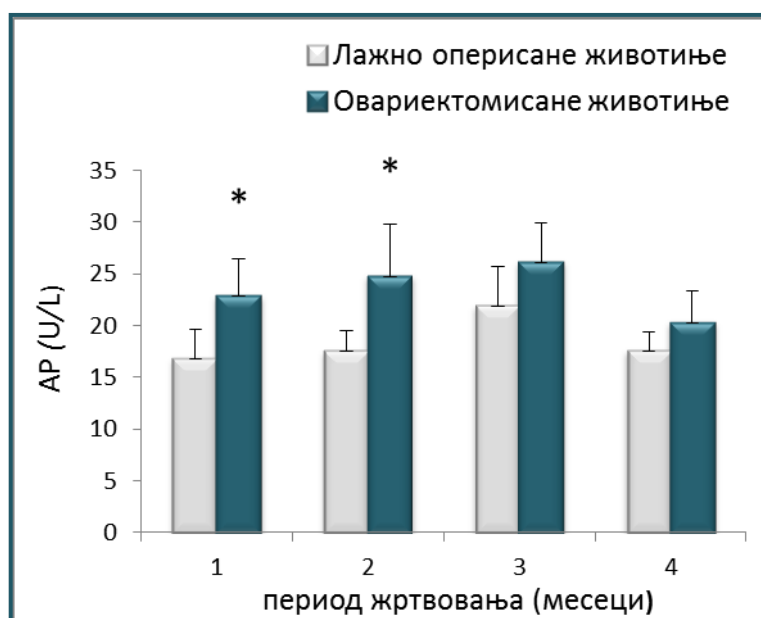
**График 5.** Активност алкалне фосфатазе (U/L) у серуму овариектомисаних и лажно оперисаних пацова током периода од четири месеца

(Подаци су представљени као средња вредност ± стандардна девијација; Резултати се сматрају статистички значајним у случају \*P<0.05)

Алкална фосфатаза је код овариектомисаних животиња, у свакој тачки мерења, показала више вредности у односу на одговарајуће лажно оперисане животиње, с тим што је ова разлика била од значаја само у другом месецу након овариектомије. Овариектомисане животиње су показале велику варијабилност у погледу активности алкалне фосфатазе, посебно у трећем месецу, и због тога се добијене вредности не сматрају статистички значајним.

### Кисела фосфатаза

Кисела фосфатаза представља маркер активности остеокласта и разградње кости. Њена вредност је одређивана током посматраног периода у серуму овариектомисаних пацова и упоређивана са вредностима добијеним у серуму одговарајућих лажно оперисаних пацова, жртвованих након истог временског периода. Разлике између ове две групе пацова у активности киселе фосфатазе су приказане по месецима на **Графику 6** и у **Табели 2**.



**График 6.** Активност киселе фосфатазе (U/L) у серуму овариектомисаних и лажно оперисаних пацова током периода од четири месеца

(Подаци су представљени као средња вредност ± стандардна девијација; Резултати се сматрају статистички значајним у случају \*P<0.05)

Измерене вредности киселе фосфатазе у серумима овариектомисаних животиња су више у поређењу са вредностима код животиња из одговарајућих контролних група током праћеног периода. Активност овог ензима након месец и два од овариектомије показује статистички значајну разлику у односу на активност добијену након лажне операције у истим временским тачкама. Три и четири месеца од овариектомије

статистичка значајност се губи, али су вредности и даље повишене у односу на вредности код одговарајућих лажно оперисаних животиња.

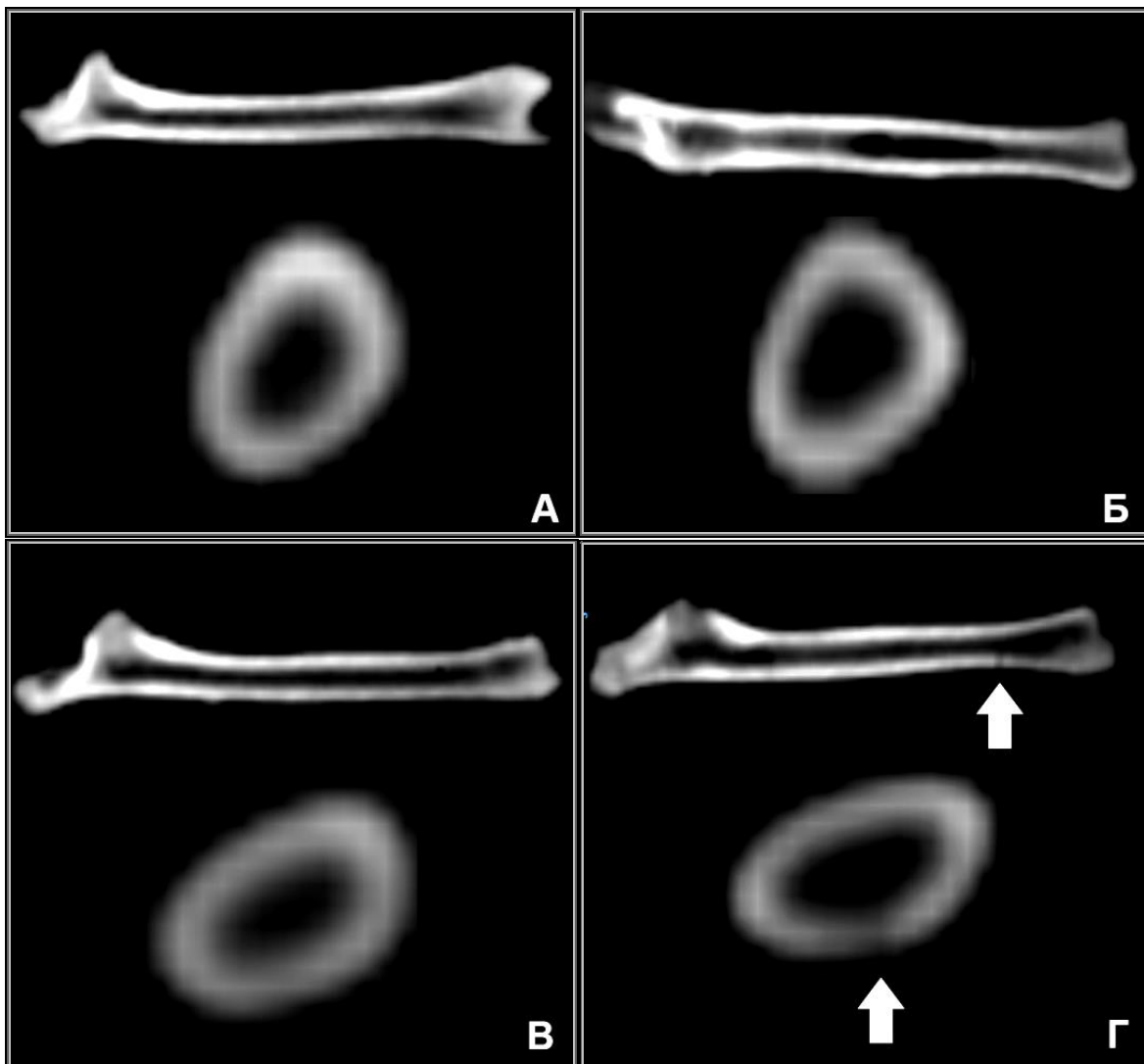
#### 4.1.3. Резултати радиолошке анализе костију

Метода компјутеризоване томографије са конусним снопом (CBVT) је коришћена у овој докторској дисертацији како би се установиле евентуалне промене у дисталном делу фемура, настале као последица овариектомије.

Након жртвовања животиња, фемури су снимани на стоматолошком СТ скенеру и репрезентативни радиолошки снимци су приказани на **Слици 7**. Резултати анализа радиолошких снимака представљени су у овој докторској дисертацији за групе овариектомисаних и лажно оперисаних животиња жртвованих три и четири месеца након операције. Након месец и два од хирушког захвата, овариектомисане животиње нису показивале никакве разлике у односу на одговарајуће лажно оперисане, тако да резултати нису посебно представљени.

Аксијални пресеци кости, који су приказани на **Слици 7**, узети су из прве трећине дисталног дела фемура. Након три месеца од овариектомије се не могу уочити промене у кортикалној кости животиња из овариектомисане групе као ни битне разлике у поређењу са контролном групом исте старости (**Слика 7А и 7Б**). Трабекуле спонгиозне кости у дисталној метафизи се не могу видети на слици због мале резолуције скенера.

Четири месеца након овариектомије, код појединих представника групе овариектомисаних животиња долази до појаве дефеката у дисталном делу фемура. Појава дефеката није запажена у контролној групи нити у групи овариектомисаних пацова жртвованих у ранијим периодима. Са **Слике 7Г** се може уочити и увећање централне шупљине фемура овариектомисаних животиња што доводи до истањења кортикалне кости, четири месеца након операције.



**Слика 7.** Радиолошки снимци фемура овариектомисаних и лажно оперисаних пацова; А - три месеца након лажне операције; Б - три месеца након овариектомије; В - четири месеца након лажне операције; Г - четири месеца након овариектомије (У горњем делу слика приказан је сагитални пресек, док је у доњем делу приказ аксијалног пресека дисталног дела дијафизе фемура)

#### 4.1.3.1. Густина кости у дисталном делу фемура

Са радиолошких снимака фемура испитиваних пацова добијених са CBVT, софтверски је одређивана радиографска густина кости (BD) целокупног волумена од интереса као и густина у кортикалном, спонгиозном и периостном делу изабраног волумена.

Резултати анализе густине кости измерене код животиња жртвованих након месец дана и два месеца од овариектомије нису посебно приказивани у овој докторској дисертацији, јер не показују значајне промене у односу на одговарајуће контролне групе. Резултати радиографских густина кости након периода жртвовања од три и четири месеца, приказани су у **Табели 3**.

**Табела 3.** Радиографска густина кости у дисталном делу фемура овариектомисаних и лажно оперисаних пацова измерена након три и четири месеца од операције

Параметри	Група	Периоди жртвовања животиња	
		3 месеца	4 месеца
tBD	ЛО	1376.95 ± 73.16	1413.13 ± 52.89
tBD	ОВ	1255.97 ± 15.40*	1239.22 ± 59.13*
kBD	ЛО	1690.53 ± 129.69	1838.65 ± 40.70
kBD	ОВ	1661.45 ± 26.91	1609.43 ± 73.31*
sBD	ЛО	1171.62 ± 154.65	1321.81 ± 147.71
sBD	ОВ	884.82 ± 36.08*	951.18 ± 48.29*
pBD	ЛО	907.11 ± 33.54	837.72 ± 57.12
pBD	ОВ	900.62 ± 17.28	892.99 ± 38.44

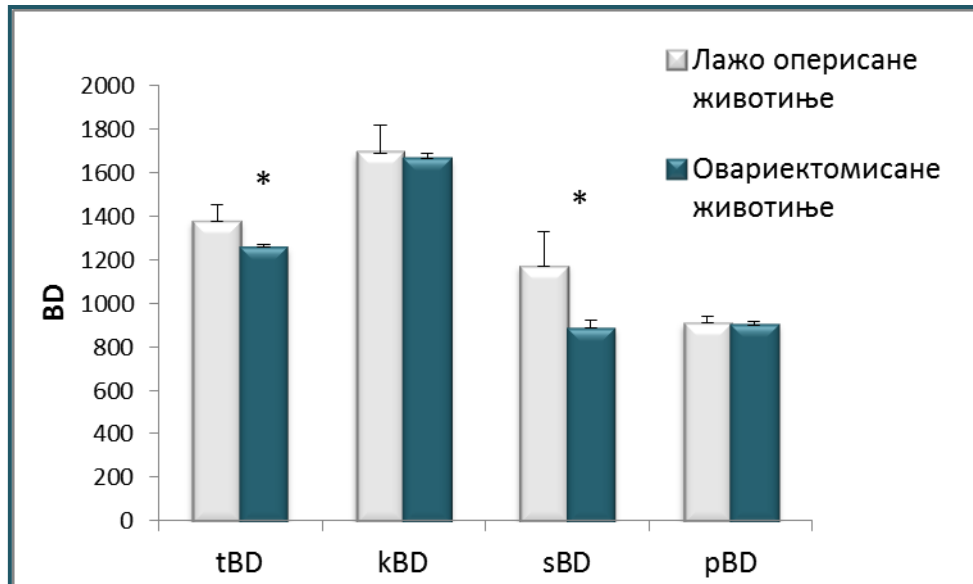
Сви подаци су представљени као средња вредност ± стандардна девијација  
 tBD – густина целог VOI у дисталној метафизи фемура, kBD – густина дела VOI који заузима кортикална кост, sBD – густина дела VOI који заузима спонгиозна кост, pBD – густина дела VOI који заузима периост

\* Вредности у групи овариектомисаних животиња (ОВ) које показују статистички значајну разлику у поређењу са одговарајућом групом лажно оперисаних животиња (ЛО), жртвованих након истог временског периода; Резултати се сматрају статистички значајним у случају \*P<0.05.

Вредности густине кости измерене код овариектомисаних и одговарајућих лажно оперисаних пацова који су жртвовани три месеца након овариектомије приказане су на **Графику 7** и у **Табели 3**.

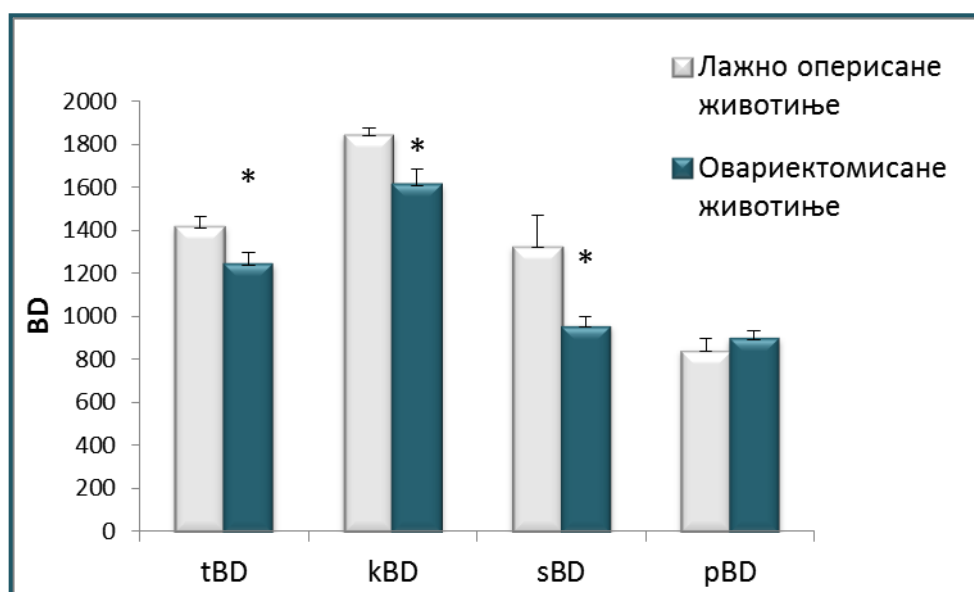
Добијени резултати показују да је након три месеца, укупна густина кости у дисталном делу фемура овариектомисаних животиња статистички значајно нижа од густине добијене у одговарајућој контролној групи. Такође, забележена је статистички значајна разлика између густине спонгиозног дела кости, при чему је група овариектомисаних пацова показала ниже вредности густине у односу на одговарајућу

групу лажно оперисаних пацова. Густина кортикалног и густина периостног дела кости се након три месеца од овариектомије нису промениле у односу на контролну групу животиња.



**График 7.** Радиографска густина кости измерена у оквиру VOI у дисталном делу фемура овариектомисаних и лажно оперисаних пацова, три месеца након операције (tBD – густина целог VOI у дисталној метафизи фемура, kBD – густина дела VOI који заузима кортикална кост, sBD – густина дела VOI који заузима спонгиозна кост, pBD – густина дела VOI који заузима периост; \*P<0.05)

Укупна густина кости у оквиру VOI као и густине кортикалног, спонгиозног и периостног дела кости, измерене у дисталном делу фемура пацова четири месеца након овариектомије или лажне операције, приказане су на **Графику 8** и у **Табели 3**.



**График 8.** Радиографска густина кости измерена у оквиру VOI у дисталном делу фемура овариектомисаних и лажно оперисаних пацова, четири месеца након операције (tBD – густина целог VOI у дисталној метафизи фемура, kBD – густина дела VOI који заузима кортикална кост, sBD – густина дела VOI који заузима спонгиозна кост, pBD – густина дела VOI који заузима периост; \*P<0.05)

У поређењу са лажно оперисаним животињама, добијени резултати показују да је код животиња жртвованих четири месеца након овариектомије дошло до смањења укупне густине кости, густине кортикалног и густине спонгиозног дела кости у оквиру VOI. Густина периостног дела је и након овог периода жртвовања остала непромењена.

Анализирањем параметра густине установљено је да су промене на костима уочене најраније три месеца након овариектомије, при чему је у том периоду променама захваћена само спонгиозна кост за коју је карактеристична висока стопа ремоделације. Промене густине у дефинисаном кортикалном делу кости се уочавају у четвртм месецу након овариектомије, док промене у густини периостног дела кости нису забележене ни у једном посматраном периоду.



## **4.2. Регенерација остеопоротичне кости уз помоћ имплантата са витамином Д**

Процес зарастања дефеката у остеопоротичној кости уз помоћ имплантата на бази витамина Д и без њега, анализиран је током периода ране и касне регенерације коришћењем биохемијских, хистолошких, имунохистохемијских, хистоморфометријских и скенинг-електрономикроскопских метода.

### **4.2.1. Биохемијски маркери коштаног метаболизма у серуму испитиваних пацова**

Биохемијски маркери праћени током зарастања дефеката у серуму испитиваних пацова различитих група су калцијум (Ca), фосфор (P), алкална фосфатаза (ALP) и кисела фосфатаза (AP). Добијени резултати су представљени према терминима жртвовања, односно према трајању периода регенерације дефекта под утицајем различитих примењених третмана.

#### **4.2.1.1. Период регенерације од две недеље**

Вредности биохемијских маркера измерене у свим експерименталним и контролним групама оваријектомисаних пацова након две недеље зарастања дефеката приказане су у **Табели 4**.

Добијени резултати показују да не постоји статистички значајна разлика у нивоу калцијума и фосфора мерених у серуму испитиваних група након периода регенерације од две недеље. Разлике у активности алкалне фосфатазе између група такође нису статистички значајне. Без обзира на то, забележене су више вредности алкалне фосфатазе у серумима животиња чији су дефекти третираны имплантатима сачињеним од ММК+PRP (СЦ група) и имплантатима базираним на алфакалцидолу (АЦ група) у односу на СР и ХЦ групу, након периода од две недеље зарастања.

**Табела 4.** Биохемијски маркери у серуму оваријектомисаних пацова након периода регенерације од две недеље

Маркер	Контролне групе		Експерименталне групе	
	СР ГРУПА	СЦ ГРУПА	ХЦ ГРУПА	АЦ ГРУПА
Са <i>mmol/L</i>	2.72 ± 0.19	2.65 ± 0.06	2.65 ± 0.14	2.51 ± 0.11
Р <i>mmol/L</i>	2.38 ± 0.53	2.02 ± 0.15	2.11 ± 0.32	2.06 ± 0.4
ALP <i>U/L</i>	118.25 ± 22	138.40 ± 20.69	114 ± 11.04	131.69 ± 18.89
AP <i>U/L</i>	37.96 ± 7.43	29.62 ± 8.15	38.13 ± 6.23	<b>24.99 ± 5.06<sup>a*σ*</sup></b>

Сви подаци су представљени као средња вредност ± стандардна девијација

<sup>a</sup> Вредности показују статистички значајну разлику у поређењу са СР групом;

<sup>σ</sup> Вредности показују статистички значајну разлику у поређењу са ХЦ групом;

\*P<0.05.

СР ГРУПА – спонтана регенерација; СЦ ГРУПА – регенерација уз помоћ ММК+PRP; ХЦ ГРУПА – регенерација уз помоћ имплантата базираних на холекалциферолу; АЦ ГРУПА – регенерација уз помоћ имплантата базираних на алфакалцидолу

Вредност киселе фосфатазе измерена након две недеље зарастања дефеката у АЦ групи је значајно нижа у односу на вредности у СР и ХЦ групама. Иако не показује статистичку значајност, вредност киселе фосфатазе измерена у АЦ групи је нижа и од вредности забележене у СЦ групи.

Алфакалцидол, према добијеним резултатима, значајно смањује вредност киселе фосфатазе у серуму након периода регенерације од две недеље. Пошто је сам носач довео до промена у маркерима изградње и разградње кости у СЦ групи у односу на СР групу (повећање вредности ALP и смањење вредности AP), холекалциферол је супримирао промене стимулисане имплантираним носачем, задржавајући вредности ових параметара на нивоу измереном у СР групи.

#### 4.2.1.2. Период регенерације од осам недеља

Вредности биохемијских маркера измерене у серумима пацова са различитим третманима након осам недеља зарастања дефеката, приказане су у **Табели 5**.

**Табела 5.** Биохемијски маркери у серуму оваријектомисаних пацова након периода регенерације од осам недеља

Маркер	Контролне групе		Експерименталне групе	
	СР ГРУПА	СЦ ГРУПА	ХЦ ГРУПА	АЦ ГРУПА
Са mmol/L	2.67 ± 0.30	2.58 ± 0.20	2.56 ± 0.04	2.50 ± 0.07
Р mmol/L	2.08 ± 0.63	2.19 ± 0.83	1.93 ± 0.12	1.76 ± 0.39
ALP U/L	117.92 ± 26.89	124.25 ± 19.28	114.20 ± 30.14	116.50 ± 25.54
AP U/L	38.76 ± 10.91	30.62 ± 6.58	27.62 ± 6.21	<b>21.99 ± 2.65<sup>a**б*</sup></b>

Сви подаци су представљени као средња вредност ± стандардна девијација

<sup>a</sup> Вредности показују статистички значајну разлику у поређењу са СР групом;

<sup>б</sup> Вредности показују статистички значајну разлику у поређењу са СЦ групом;

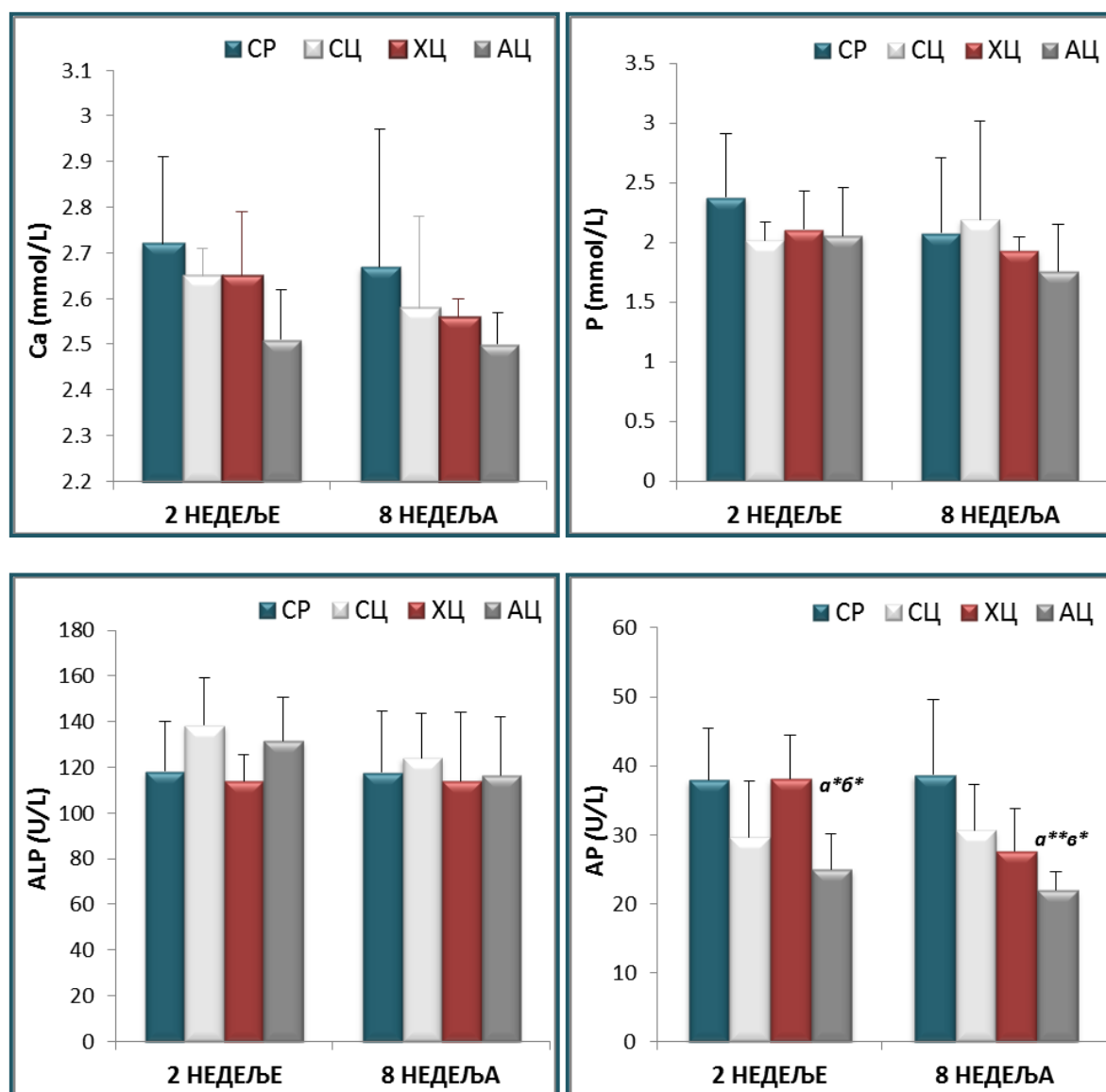
\*P<0.05;\*\* P<0.01.

СР ГРУПА – спонтана регенерација; СЦ ГРУПА – регенерација уз помоћ ММК+PRP; ХЦ ГРУПА – регенерација уз помоћ имплантата базираних на холекалциферолу; АЦ ГРУПА – регенерација уз помоћ имплантата базираних на алфакалцидолу;

Концентрације калцијума и фосфора у серумима животиња не показују статистички значајне разлике између група након осам недеља зарастања дефеката, (**Табела 5**) нити показују промене у оквиру исте групе, између два периода мерења (**График 9**).

Након осам недеља регенерације остеопоротичне кости, измерена активност алкалне фосфатазе се не разликује значајно између група (**Табела 5**). Вредности AP у свим групама су приближне и у нивоу вредности које су забележене у СР групи (**Табела 5** и **График 9**). Са **Графика 9** се, такође, може видети да су вредности ALP измерене након осам недеља у СЦ и АЦ групи доста ниже у односу на вредности измерене у овим групама након две недеље зарастања што указује на враћање активности ALP на ниво, забележен у групи без икаквог третмана (негативна контрола,

CP група). Због великих разлика у одговору животиња исте групе на третман, ове промене нису статистички значајне.



**График 9.** Биохемијски маркери у серуму оваријектомисаних пацова након периода регенерације од две и осам недеља

<sup>a</sup> Вредности показују статистички значајну разлику у поређењу са CP групом;

<sup>б</sup> Вредности показују статистички значајну разлику у поређењу са XQ групом;

<sup>в</sup> Вредности показују статистички значајну разлику у поређењу са CQ групом;

Вредности не показују статистички значајну разлику у оквиру исте групе, између два периода жртвовања;

\*P<0.05; \*\* P<0.01.

Након периода регенерације од осам недеља, забележен је значајно нижи ниво киселе фосфатазе у АЦ групи у поређењу са контролним, СЦ и СР групама (**Табела 5, График 9**). Добијена вредност је такође нижа и од вредности забележене у ХЦ групи, али ова разлика није статистички значајна.

Вредност киселе фосфатазе у АЦ групи се у посматраним периодима одржава на скоро истом нивоу (**График 9**). Разлике које су након периода регенерације од две недеље постојале између АЦ и ХЦ групе (**Табела 4**) нису више значајне, јер је забележен велики пад активности киселе фосфатазе у ХЦ групи након осам недеља зарастања дефеката који се може видети са **Графика 9**. Ово смањење активности киселе фосфатазе у ХЦ групи у периоду између две и осам недеља зарастања је велико, са статистичком значајношћу од  $P = 0.056$ , али због дефинисане границе значајности ( $P < 0.05$ ), на графику није обележено као статистички значајно .

Према добијеним резултатима, третман алфакалцидолом одржава вредност киселе фосфатазе на ниском нивоу и након периода регенерације од осам недеља. Холекалциферол накнадно смањује активност АР у односу на период регенерације од две недеље.

#### 4.2.2. Хистолошка анализа дефеката у остеопоротичној кости

Зарастање дефеката у остеопоротичном фемуру праћено је хистолошки, уз помоћ бојења хематоксилин-еозином (HE), трихромног бојења по *Masson*-у (TM) и бојења толуидин плавим (TB).

Резултати хистолошке анализе дефекта животиња из експерименталних и контролних група који су зарастали под утицајем испитиваних третмана су показали разлике у начину формирања калуса, квантитету и квалитету новоформиране кости, као и заступљености материјала у дефекту.

##### 4.2.2.1. Дефекти након периода зарастања од две недеље

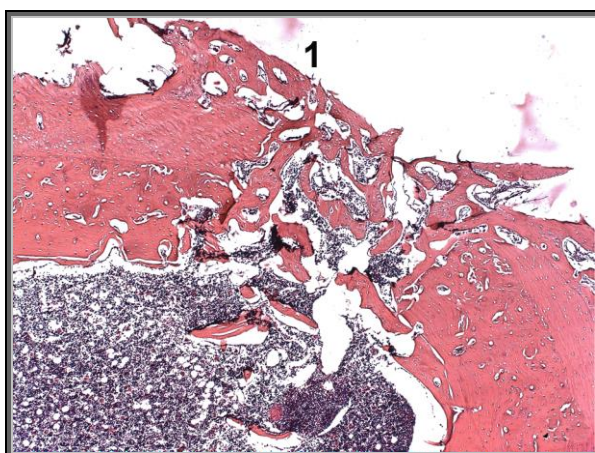
Као први термин жртвовања животиња изабран је период од две недеље након креирања дефеката и урађених имплантација.

###### 4.2.2.1.1. Спонтана регенерација остеопоротичне кости

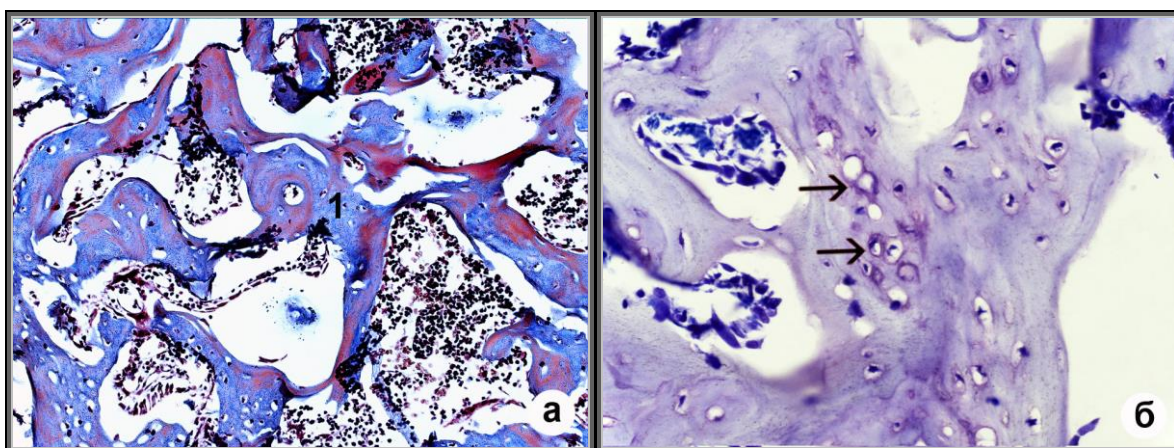
Зарастање дефеката у остеопоротичном фемуру пацова у негативној контроли (CP група), након периода регенерације од две недеље, приказано је на **Сликама 8 и 9**.

У CP групи се уочава формиран спољашњи калус у виду ткз. моста који готово спаја крајеве прекинуте кости (**Слика 8**), док се у центру дефекта могу уочити расуте трабекуле које су окружене ћелијама костне сржи које синтетишу коштани матрикс (**Слике 8 и 9**).

Калус је делом коштане природе, док се у неким деловима још увек може идентификовати хипертрофија хондроцита и ендохондрална осификација (**Слика 9а и 9б**).



**Слика 8.** Хистолошка слика дефеката у СР групи оваријектомисаних пацова, две недеље након операције; HE, x50; 1 – спољашњи калус



**Слика 9.** Калус у дефекту СР групе, две недеље након операције; а) ТМ, x200; б) хипертрофија хондроцита, ТВ, x400; 1 – трабекула новоформиране кости;

Новоформирана кост је трабекуларног типа и окружена је расутиим мезенхимским ћелијама, вероватно пореклом из костне сржи, које не показују видљиву организацију. Изграђена је претежно из неминерализованог колагена који се боји плаво коришћењем ТМ бојења, док се видљиви знаци минерализације могу уочити дуж трабекула и око остеоона (црвена боја на пресецима са ТМ бојењем) (Слика 9а).

#### 4.2.2.1.2. Регенерација остеопоротичне кости уз помоћ имплантата сачињених од минералног матрикса кости и PRP

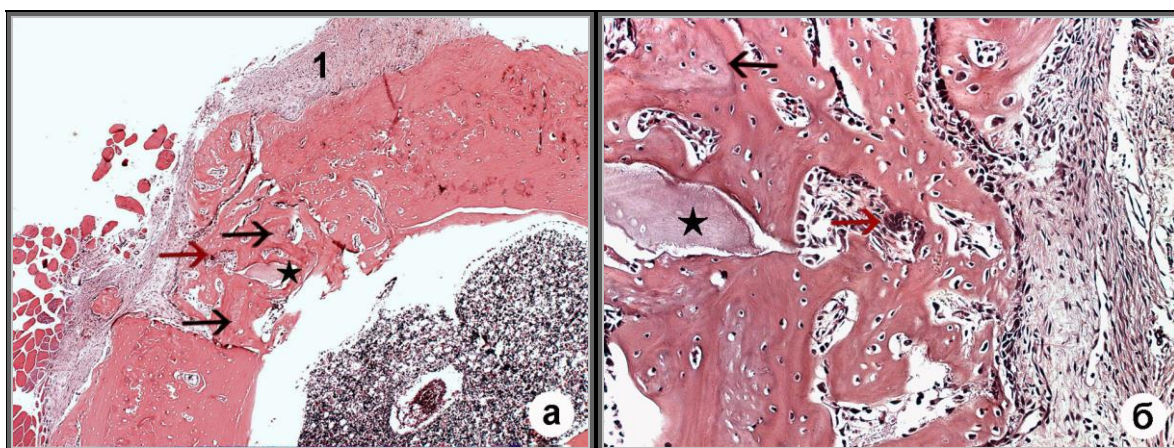
На **Слици 10** је приказано зарастање дефеката животиња из СЦ групе, две недеље након имплантације ММК+PRP носача.

Са хистолошке слике се уочава хиперплазија везивно-ткивних ћелија које прекривају новоформиран калус са спољашње стране као и површину старе кости око места дефекта (**Слике 10а, 10б и Слика 12**). Између ћелија фиброзног слоја се могу уочити дебела колагена влакна која указују на већ насталу фиброзу (плаво обојење на **Слици 12**).

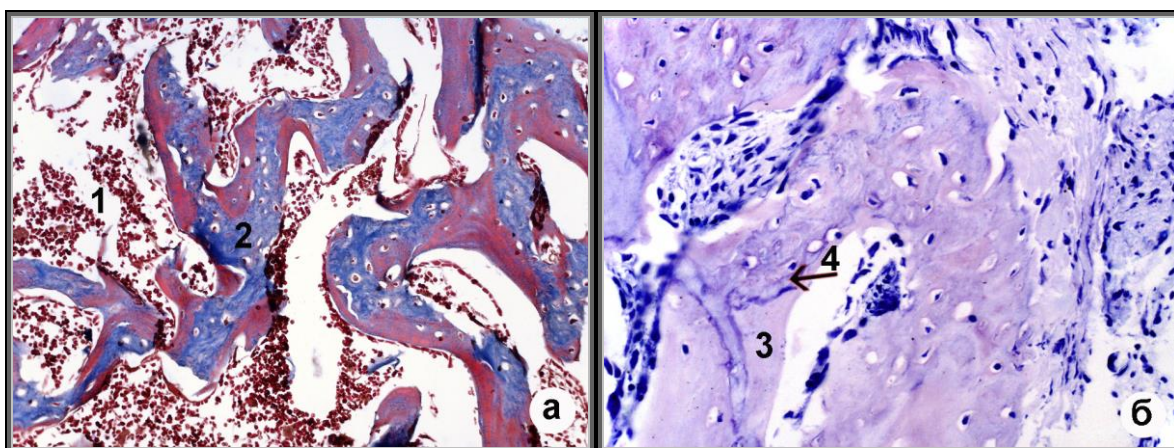
На **Слици 12** приказује добро развијен спољашњи калус, као и трабекуле унутрашњег калуса које су расуте између крајева прекинуте кости и окружене ћелијама костне сржи. Са **Слика 10а и 10б** се може видети да се калус претежно формира око, и на месту убачених партикула ММК. Мали број ММК партикула је још увек остао ненасељен и оне су окружене новоформираном кости са којом показују слабу интеграцију.

Новоформирана кост је трабекуларна, као и у СР групи, и показује већи степен површинске минерализације, док се средином трабекула протеже младо неминерализовано коштано ткиво (остеоид) или хрскавица која се постепено замењује коштаном ткивом (**Слика 11а и 11б**). Количина новонасталих трабекула није иста читавом дубином дефекта и пажљивим посматрањем се може разликовати од насељеног, интегрисаног биоматеријала (**Слика 10а**). Велика количина везивног ткива настала инфилтрацијом везивно-ткивних ћелија са површине и мезенхимских ћелија пореклом из костне сржи испуњава шупљине између трабекула (**Слика 10а, 10б и Слика 12**).



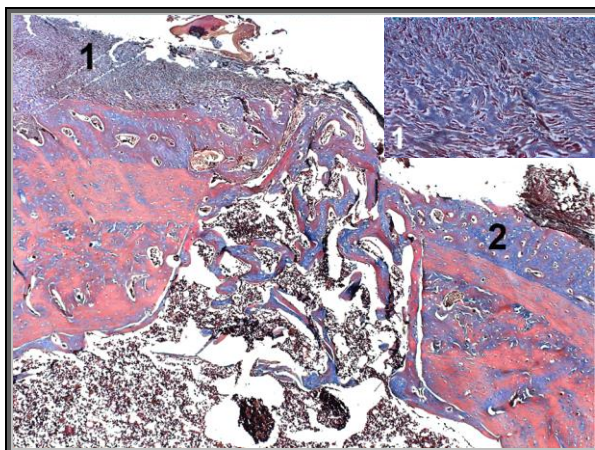


**Слика 10.** Хистолошка слика дефеката у СЦ групи оваријектомисаних пацова, две недеље након имплантације; а) НЕ, x50; б) замена партикула ММК, остеокласти и остеобласти у месту дефекта, НЕ, x200; 1 – фиброзно ткиво; Црна стрелица – репопулација и постепена замена партикула ММК; Црвена стрелица – остеокласти; ★ – партикуле ММК;



**Слика 11.** Калус у дефекту СЦ групе, две недеље након имплантације; а) ТМ, x200; б) ТВ, x400; 1 – везивно ткиво; 2 – трабекуле новоформиране кости; 3 – коштани калус; 4 – остеоид;

Присуство гигантских мултинуклеарних ћелија на периферији се не уочава док се у шупљинама између трабекула могу видети затечени остеокласти, умерених димензија, издуженог или овалног облика (Слика 10б). Кубичасти остеобласти, који се такође могу видети на Слици 10б, синтетишу матрикс нове кости пратећи остеокласте.



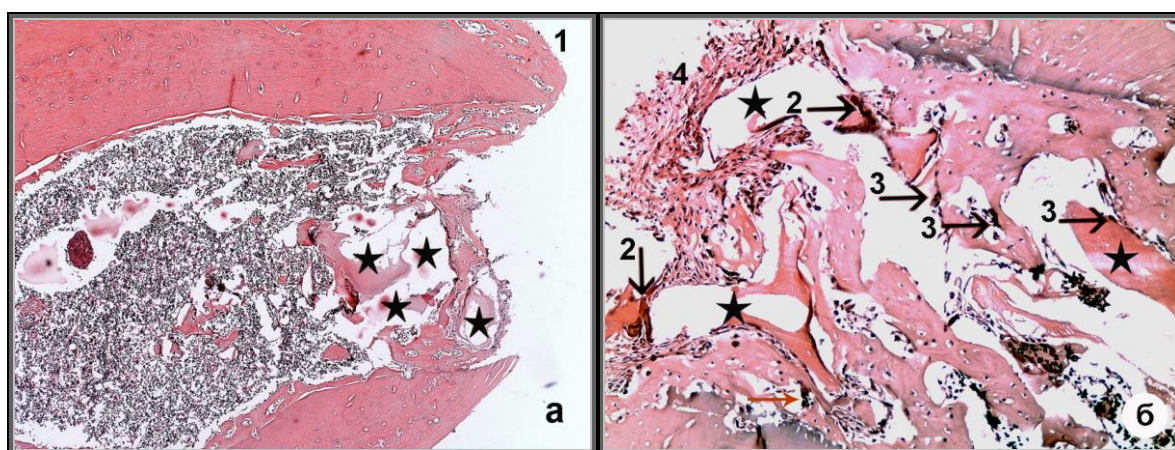
**Слика 12.** Фиброзно ткиво и новоформиран спљашњи калус код пацова из СЦ групе, две недеље након имплантације; ТМ, х50; 1 – фиброза; 2 – спљашњи калус;

#### *4.2.2.1.3. Регенерација остеопоротичне кости уз помоћ имплантата са холекалциферолом*

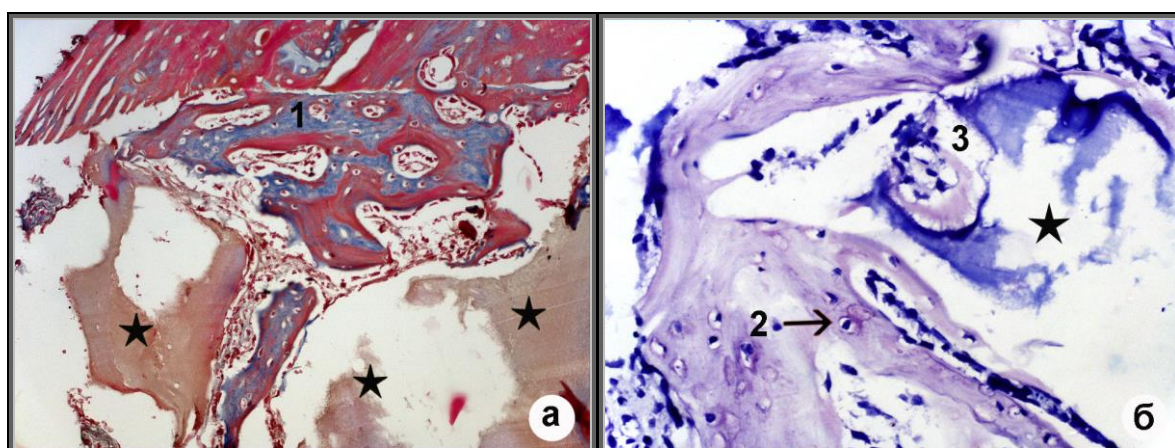
Дефект у фемуру животиња ХЦ групе приказан је на **Слици 13**. Велика количина ММК партикула и солидна количина новоформиране кости се може уочити на приказаним пресецима. Уочено је једнострано присуство спљашњег калуса на површини кости око места дефекта (**Слика 13а**). Калус у дефекту се формира највећим делом уз стару кост и у виду уског моста који спаја крајеве дефекта (**Слика 13а**). Мали број трабекула се може уочити и у области костне сржи (**Слика 13а**).

Празнина која се уочава на површини дефекта потиче од ММК партикула које су остале у растварачима приликом обраде узорака кости због још увек непотпуне интеграције (**Слика 13а**).

Новоформирана кост делује зрелије од кости у претходним групама, са интензивнијом периферном минерализацијом и бољом интеграцијом између новонасталих делова у оквиру трабекула (**Слика 14а**). Остаци хипертрофичних хондроцита се могу уочити у појединим деловима калуса (**Слика 14б**).



**Слика 13.** Хистолошка слика дефеката у ХЦ групи оваријектомисаних пацова, две недеље након имплантације; а) НЕ, x50; б) грануломатозна реакција и мултинуклеарне гигантске ћелије у дефекту, НЕ, x100; 1 – спољашњи калус; 2 – мултинуклеарне гигантске ћелије; 3 – ћелије налик остеокластима; 4 – грануломатозна реакција; ★ – партикуле ММК;



**Слика 14.** Калус у дефекту ХЦ групе, две недеље након имплантације; а) ТМ, x200; б)ТВ, x400; 1 – трабекуле новоформиране кости; 2 – хипертрофија хондроцита; 3 – нова кост у имплантираној партикули ММК; ★ – партикуле ММК;

Коштане трабекуле опкољавају партикуле ММК у дефекту (Слика 14а и 14б), док се на неким местима може видети и синтеза нове кости у оквиру имплантиране партикуле биоматеријала (Слика 14 б).

Мултинуклеарне гигантске ћелије са преко 20 једара се могу уочити у области дефекта ХЦ групе који је захваћен грануломатозном реакцијом (периферни део

дефекта на **Слици 13б**). На површини ММК партикула и трабекула нове кости се могу видети остеокласти мањих димензија (**Слика 13б**). Грануломатозна реакција, која се јавља током репаративног процеса, је солидно развијена и сконцентрисана на површини дефекта (**Слика 13б**).

#### 4.2.2.1.4. Регенерација остеопоротичне кости уз помоћ имплантата са алфакалцидолом

Дефект у процесу зарастања код животиња из АЦ групе се може видети на **Слици 15**. У месту дефекта се уочава мало новоформираног калуса. Велика количина везивно-ткивних ћелија окружује бројне партикуле ММК које заузимају највећи део дефекта.

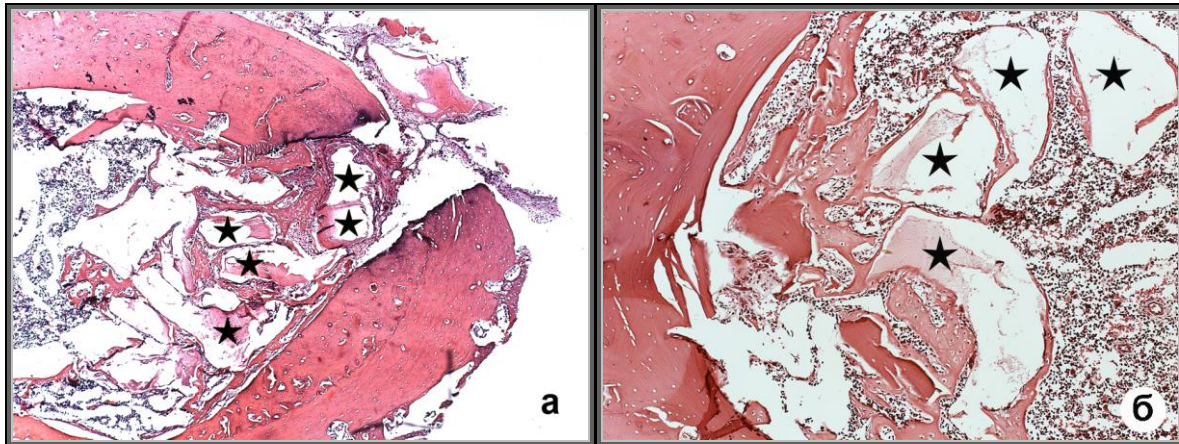
За АЦ групу је, након периода регенерације од две недеље, карактеристична синтеза колагена који изграђује младу, незрелу кост (**Слика 16а и 16б**). Интензивна синтеза је уочена претежно око крвних судова (светло плаво обојење на **Слици 16б**).

Незрела кост настала у дефекту животиња АЦ групе је високо целуларизирана и претежно изграђена од густо пакованог неминерализованог колагена због чега се види као интензивно плаво обојење на **Слици 16а**. Минерализација је периферна и готово не приметна за разлику од осталих, претходно описаних, група у којима кост делује знатно зрелије, са израженијом минерализацијом (црвено обојење на **Слици 16а**).

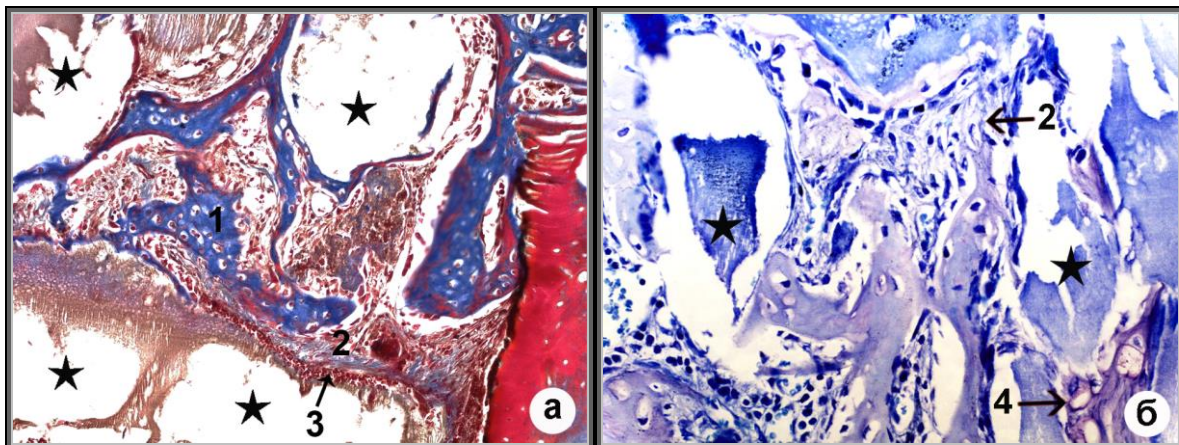
Поред коштаног, у дефекту се може срести и калус хрскавичаве природе (**Слика 16б**). Присуство широко распрострањених крвних судова у дефекту је такође карактеристика ове групе (**Слика 16а**).

**Слика 17** приказује грануломатозну реакцију са гигантским мултинуклеарним ћелијама које су саставна компонента реакције организма на повреду и инсерцију страног тела (енг. *Foreign body reaction*) и могу се уочити у околном меком ткиву, изван места дефекта. Грануломатозну реакцију чини мноштво растреситих моноклеарних ћелија у којима се може наћи солидан број мултинуклеарних гигантских ћелија које окружују партикуле биоматеријала (**Слика 17б**). Реакција организма на присуство страног тела, виђена у АЦ групи, није довела до синтезе дебelih колагених влакана (**Слика 17а и 17б**), као што је то случај са СЦ групом, где је фиброза већ унапредовала.

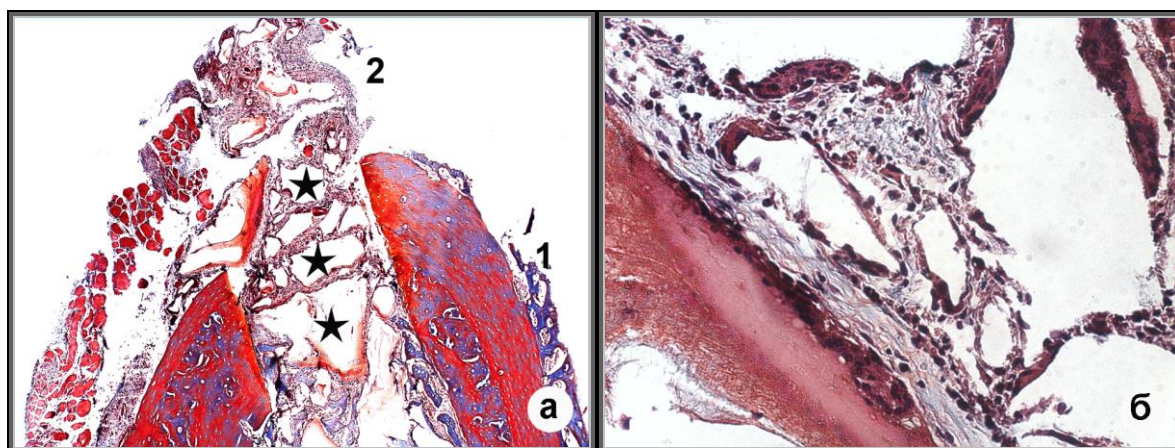
Гигантске мултинуклеарне ћелије настале фузионисањем макрофага у покушају да фагоцитују унето странио тело нису карактеристичне за само место дефекта већ су део реакције околног меког ткива на присуство биоматеријала који се расуо и око места дефекта.



Слика 15. Хистолошка слика дефеката у АЦ групи оваријектомисаних пацова, две недеље након имплантације; а) НЕ, х50; б) калус у области костне сржи, НЕ, х100; ★ – партикуле ММК;



Слика 16. Калус у дефекту АЦ групе, две недеље након имплантације; а) ТМ, х200; б) ТВ, х400; 1– трабекуле новоформиране кости; 2 – колагени матрикс у процесу формирања; 3 – крвни суд; 4 – хрскавица; ★ – партикуле ММК;



**Слика 17.** Грануломатозна реакција са мултинуклеарним гигантским ћелијама око места дефекта у АЦ групи пацова, две недеље након имплантације; ТМ, а) x50; б) мултиједарне гигантске ћелије, x400; 1 – спољашњи калус; 2 – грануломатозна реакција; ★ – партикуле ММК;

Партикуле ММК у дефекту су окружене уским трабекулама новоформиране кости (у унутрашњости дефекта, ближе костној сржи) или танким слојем везивно-ткихвих ћелија који је богат крвним судовима (на периферији дефекта) (Слике 15а, 15б и 17а). Спољашњи калус је слабо изражен у раној фази регенерације (Слика 17а).

У АЦ групи пацова се, након 2 недеље зарастања дефеката, може уочити формирање нове кости у области костне сржи, још пре почетка места дефекта (Слика 15б). Нова кост се формира уз учешће мезенхимских ћелија костне сржи и количина формираних трабекула у шупљини костне сржи је већа него у самом дефекту.

#### **4.2.2.2. Дефекти након периода зарастања од осам недеља**

Други период жртвовања животиња, изабран за процену процеса регенерације дефеката у остеопоротичној кости под утицајем различитих комбинација третмана, је осам недеља након имплантација.

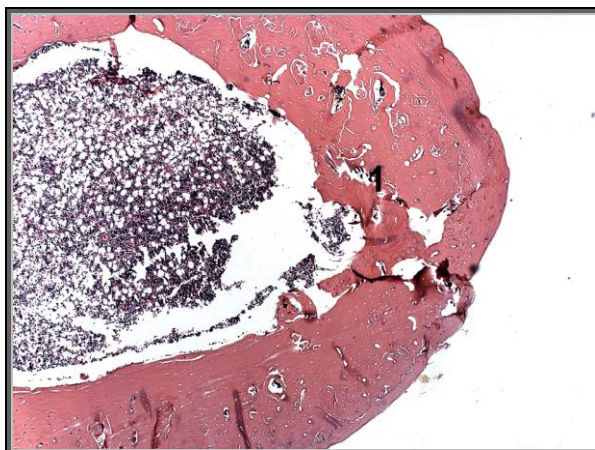
##### *4.2.2.2.1. Спонтанa регенерација остеопоротичне кости*

Дефект у фемуру животиња СР групе приказан је на **Слици 18**. Оно што је карактеристично за групу са спонтаном регенерацијом је немогућност успостављања добре интеграције са старом, околном, остеопоротичном кости (**Слике 18 и 19а**). Граница између нове и старе кости је јако изражена и често није линеарна већ у виду већих шупљина које чине место дефекта фрагилним и подложим новим преломима.

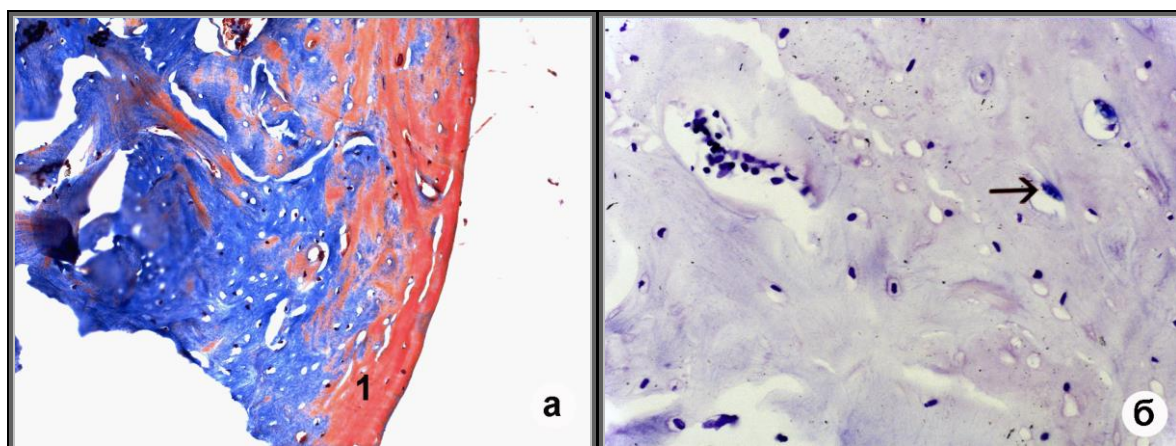
Након периода зарастања од осам недеља, у групи са спонтаном регенерацијом је на површини дефекта дошло до формирања секундарног калуса сачињеног из зреле кости са видљивом ламеларном структуром, остеоцима и минерализацијом, док је унутрашњи део калуса, ближи костној сржи, слабије минерализован и још увек вртложне природе (**Слике 19а и 19б**).

На **Слици 19а** се може видети да су границе дефекта, као и део калуса ближи костној сржи, слабије минерализовани. У остеоцима се могу уочити остеокласти који врше њихову ремоделацију (**Слика 19б**).

Новоформирана кост је остеопоротичне, порозне, структуре, прожета шупљинама и просторима испуњеним везивно-ткивним ћелијама (**Слике 18, 19а и 19б**).



**Слика 18.** Хистолошка слика дефеката у СР групи оваријектомисаних пацова, осам недеља након операције; HE, x50; 1 – граница између старе и нове кости;



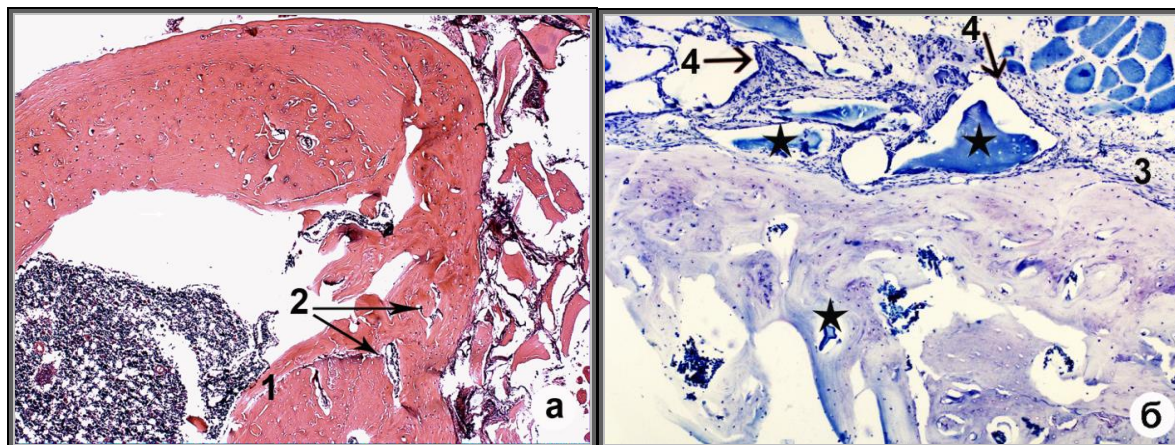
**Слика 19.** Калус у дефекту СР групе, осам недеља након операције; а) ТМ, x200; б) остеокласти који врше ремоделацију остеоона, ТВ, x400; 1 – зрела кост;

#### 4.2.2.2.2. Регенерација остеопоротичне кости уз помоћ имплантата сачињених од минералног матрикса кости и PRP

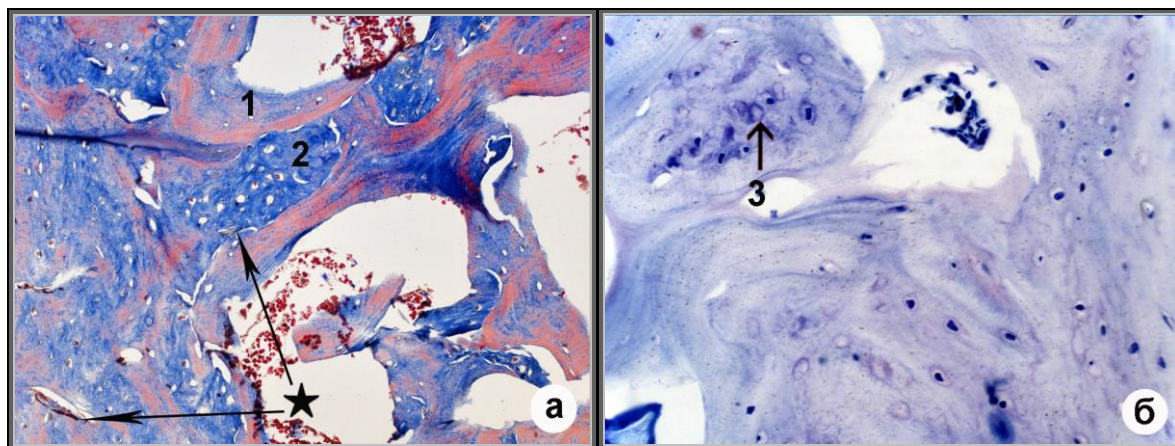
Дефект у остеопоротичној кости који је зарастао уз помоћ минералног матрикса кости и PRP, приказан је на **Слици 20**. Калус у СЦ групи животиња је настао претежно уместо парткула биоматеријала (**Слике 20б, 21а и 21б**) због чега не испуњава читаву унутрашњост дефекта и заузима неправилан облик (**Слике 20а и 20б**).



Остаци ММК се могу уочити на неким местима у дефекту и још увек је активна њихова замена коштаном ткивом (Слика 21а). Ретко се у месту дефекта уочавају веће партикуле биоматеријала.



Слика 20. Хистолошка слика дефеката у СЦ групи оваријектомисаних пацова, осам недеља након имплантације; а) НЕ, х50; б) 1 – граница дефекта испуњена везивним ткивом; 2 – везивно ткиво у калусу; 3 – фиброза; 4 – мултинуклеарне ћелије око партикула материјала; ★ – партикуле ММК;



Слика 21. Калус у дефекту СЦ групе, осам недеља након имплантације; а) ТМ, х200; б) ТВ, х400; 1 – зрела кост у калусу; 2 – незрела кост у калусу; 3 – хипертрофија хондроцита; ★ – партикуле ММК;

Калус у СЦ групи је изграђен делом од вртложне а делом од ламеларне кости (Слика 20б и 21а). Такође се може уочити хипертрофија тромбоцита и процес ендохондралне осификације на појединим местима у дефекту (Слика 21б). Ламеларна, зрела кост, је присутна по ободима калуса док се унутар ње налази незрела, вртложна кост настала у процесу ремоделације и замене партикула биоматеријала новом кости. Вртложна кост није још увек добро интегрисана са зрелом, ламеларном кости. Ламеларна кост показује добру минерализацију (Слика 21а).

За унутрашњост дефекта карактеристично је присуство велике количине везивног ткива које се може уочити и на граници између старе и нове кости (Слика 20а). Присуство ћелија везивног ткива омета интеграцију новоформиране кости и чини место дефекта подложним даљим преломима.

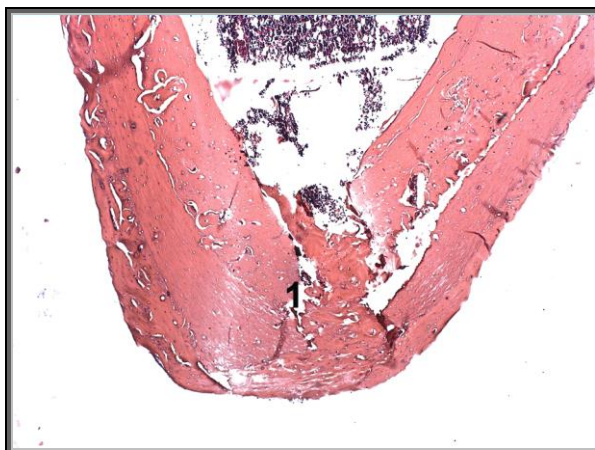
Фиброза која је настала на површини дефекта током ране фазе регенерације се задржала и након периода од осам недеља (Слика 20б). У ткиву око места дефекта се могу видети мултинуклеарне гигантске ћелије које окружују партикуле нересорбованог материјала (Слика 20б).

#### *4.2.2.2.3. Регенерација остеопоротичне кости уз помоћ имплантата са холекалциферолом*

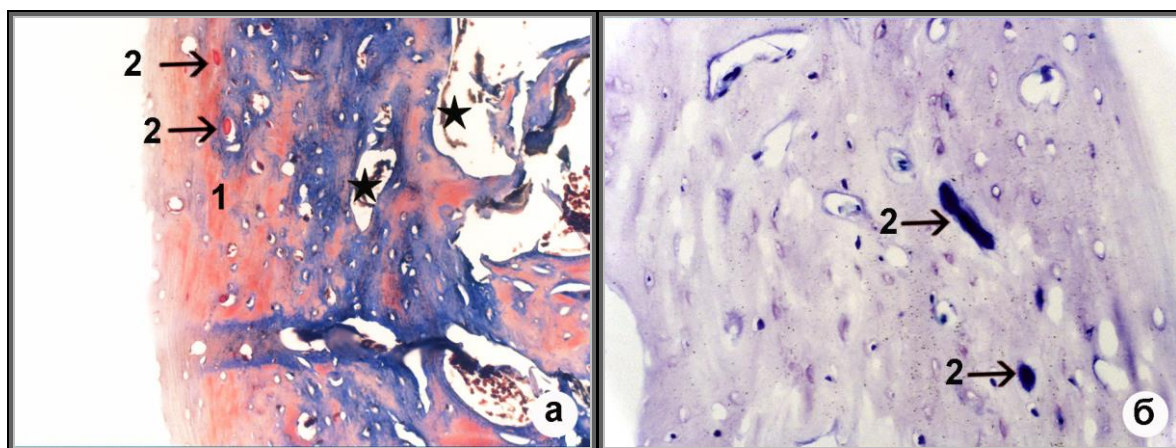
Место дефекта у ХЦ групи приказано је на Слици 22. Гранична линија дефекта је јако изражена са неправилним ивицама (Слика 22).

Калус који је настао под утицајем холекалциферола не показује компактну структуру и прожет је великим бројем широких, празних лакуна и шупљина (Слика 23а и 23б).

Нова кост је одлично минерализована (Слика 23а), са ламеларном структуром која се може уочити на површини калуса. Још увек неправилна организација колагених фибрила даје овој кости изглед вртложне, незреле кости (Слика 22), иако је минерализација, која је пратећи процес сазревања, јако изражена ширином читавог калуса. Присуство хрскавице у калусу се не уочава након осам недеља регенерације (Слика 23б)



Слика 22. Хистолошка слика дефеката у ХЦ групи овариектомисаних пацова, осам недеља након имплантације; HE, x50; 1 – граница дефекта;



Слика 23. Калус у дефекту ХЦ групе, осам недеља након имплантације; а) ТМ, x200; б) ТВ, x400; 1 – зрела кост; 2 – крвни судови; ★ – партикуле ММК;

Грануле ММК, које су знатно мањих димензија у односу на исте, забележене након две недеље регенерације, се задржавају на појединим местима у калусу (Слика 23а). За разлику од претходних, контролних група, дуж калуса се може уочити велики број крвних судова.

#### 4.2.2.2.4. Регенерација остеопоротичне кости уз помоћ имплантата са алфакалцидолом

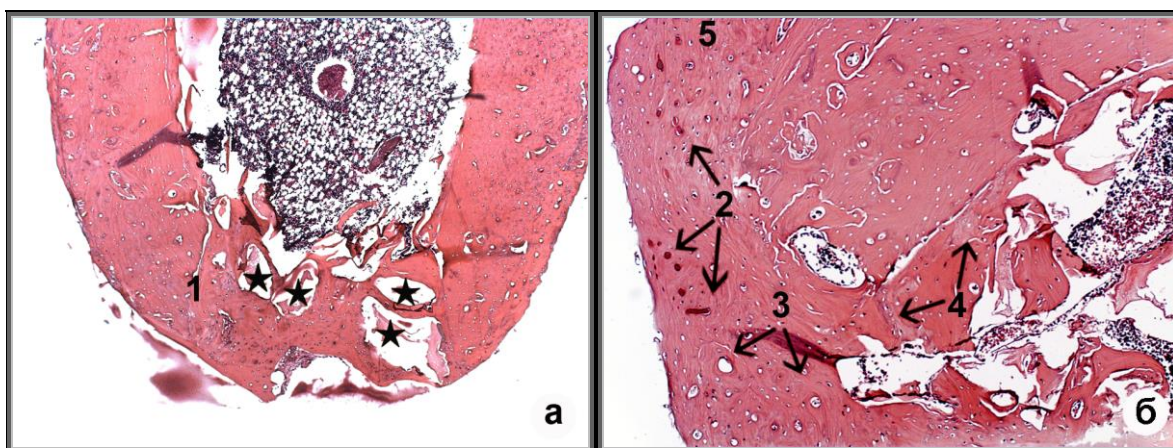
Дефект у фемуру оваријектомисаних животиња АЦ групе након периода регенерације од два месеца је приказан на **Слици 24**.

Калус у дефекту је одлично интегрисан са околном кости, са скоро неприметном граничном линијом (**Слика 24а**). Кост која је настала је великим делом ламеларна и због тога има изглед компактне зреле кости (**Слика 24а**) упркос слабијој минерализацији која указује на закасни процес сазревања (**Слика 25а**). Забележено стање је супротно оном које се могло видети у ХЦ групи где је кост која испуњава дефект делом вртложног типа али са добром минерализацијом.

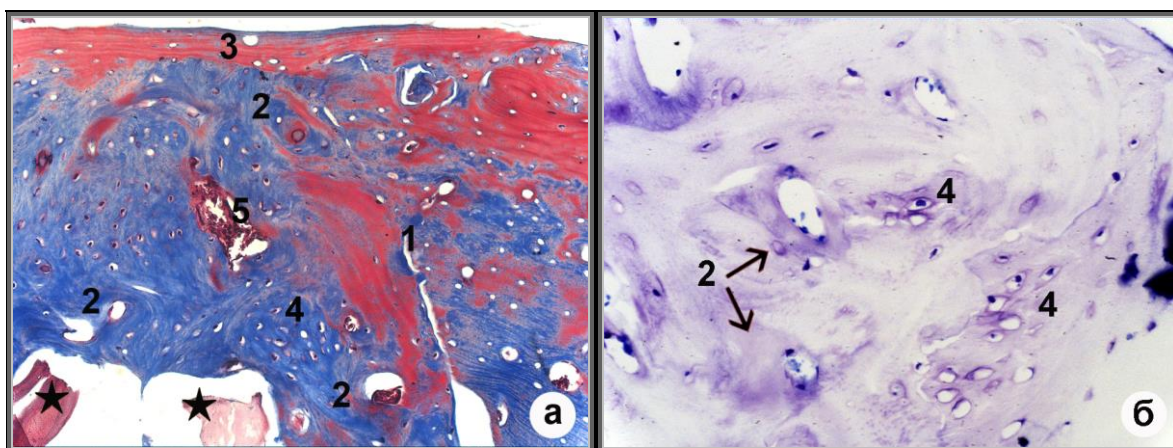
Процес минерализације је захватио површину калуса као и граничне делове уз стару кост (црвено обојење на **Слици 25а**) док је унутрашњост калуса још увек неминерализована. Колагена влакна око остеоона показују изражену ламеларну структуру (**Слике 24б и 25а**).

Поред места са паралелно распоређеним колагеним фибрилама постоје и делови калуса у којима се уочава и млада, високо-целуларизована незрела кост створена у широко уочљивом процесу интензивне ремоделације који је карактеристичан за ову групу (**Слике 25а и 25б**). Незрела кост настала у процесу ремоделације показује одличну интеграцију са околном кости.

Присуство великог броја крвних судова и остеоона је карактеристика АЦ групе (**Слике 24б и 25а**). На појединим пресецима се може уочити спуштање спољашњег калуса у место дефекта и његово сједињавање са калусом насталим у области дефекта (**Слика 24б**).



**Слика 24.** Хистолошка слика дефеката у АЦ групи овариектомисаних пацова, осам недеља након имплантације; а) НЕ, x50; б) широко распрострањени крвни судови и остеоци у калусу АЦ групе и спуштање спољашњег калуса у место дефекта, НЕ, x100; 1 – граница дефекта; 2 – крвни судови; 3 – остеоци; 4 – млада кост; 5 – спољашњи калус; ★ – партикуле ММК;



**Слика 25.** Калус у дефекту АЦ групе, осам недеља након имплантације; а) ТМ, x200; б) ТВ, x400; 1 – граница дефекта; 2 – остеоци; 3 – зрела кост; 4 – незрела, високо-целуларизована кост настала у ремоделацији; 5 – ремоделациона јединица; ★ – партикуле ММК;

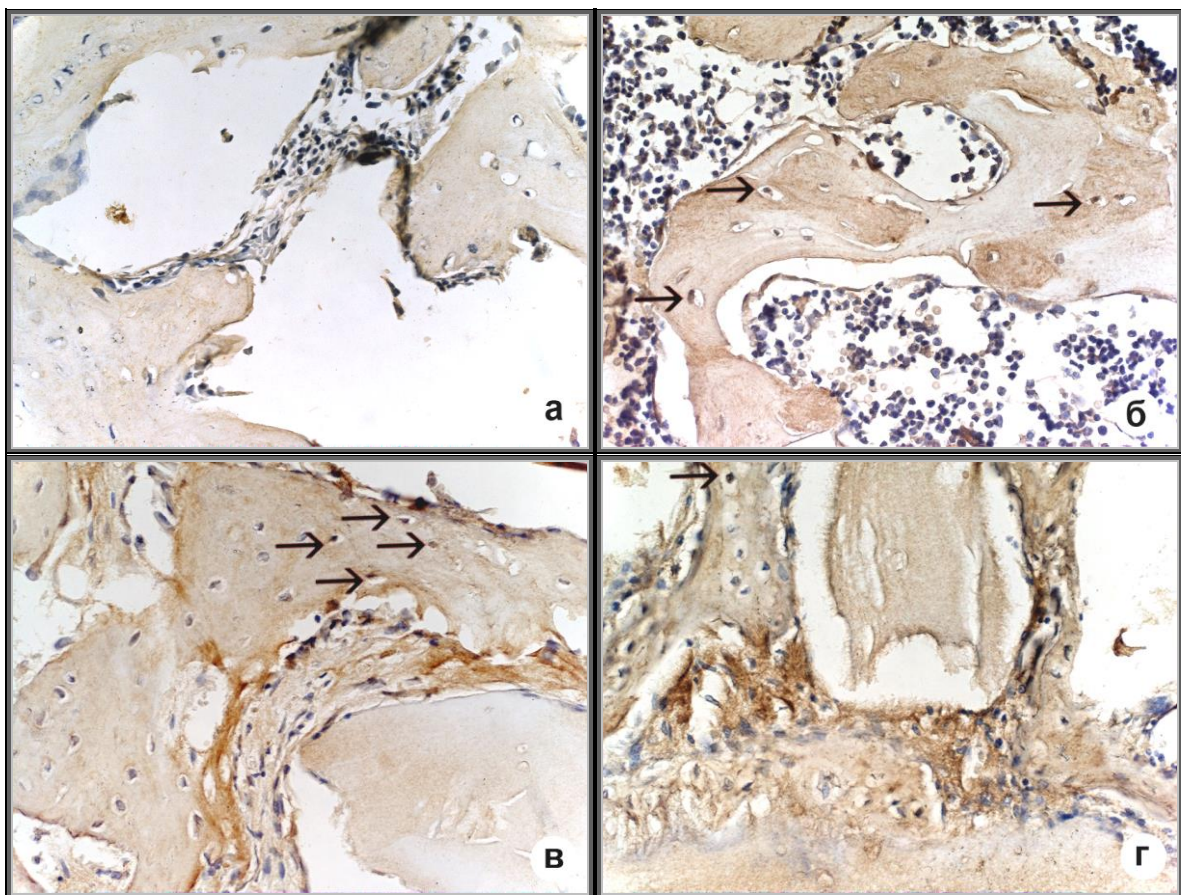
Читав калус који је настао након осам недеља у дефекту животиња АЦ групе је испрекидан великим бројем партикула ММК чија је ресорпција очигледно слаба (Слике 24а и 25а). Око њих се налази новоформирана кост. На појединим местима се може уочити замена ММК младом кости (Слика 24б).

### 4.2.3. Имунохистохемијска анализа дефеката у остеопоротичној кости

#### 4.2.3.1. Остеопонтин у месту дефекта

##### 4.2.3.1.1. Период регенерације од две недеље

Имуноекспресија остеопонтина, као раног остеогеног маркера, приказана је на Слици 26а-г.



**Слика 26.** Имуноекспресија остеопонтина у дефектима код остеопоротичних пацова из испитиваних група након периода регенерације од две недеље; а – СР група, б – СЦ група, в – ХЦ група, г – АЦ група (x400); стрелице – позитивне ћелије у калусу

Позитивност ћелија у калусу као и везивног ткива у дефекту се може уочити у свим групама са најмањим интензитетом забележеним у СР групи (**Слика 26а**). У њој се могу видети мултинуклеарни остеокласти на површини новоформиране кости.

Интензивна имуноекспресија овог неколагеног протеина матрикса се може видети у АЦ и ХЦ групи на местима синтезе кости, око партикула биоматеријала (**Слике 26в и 26г**). За разлику од АЦ групе у којој ћелије у трабекулама показују претежно негативну експресију остеопонтин, у СЦ и ХЦ групи су у лакунама калуса заступљене и позитивне и негативне ћелије (**Слика 26б и 26в**), са израженијом имуноекспресијом у ХЦ групи.

На основу поља позитивних на остеопонтин, у СЦ групи се могу уочити места замене ММК партикула новом кости (**Слика 26б**).

#### 4.2.3.1.2. Период регенерације од осам недеља

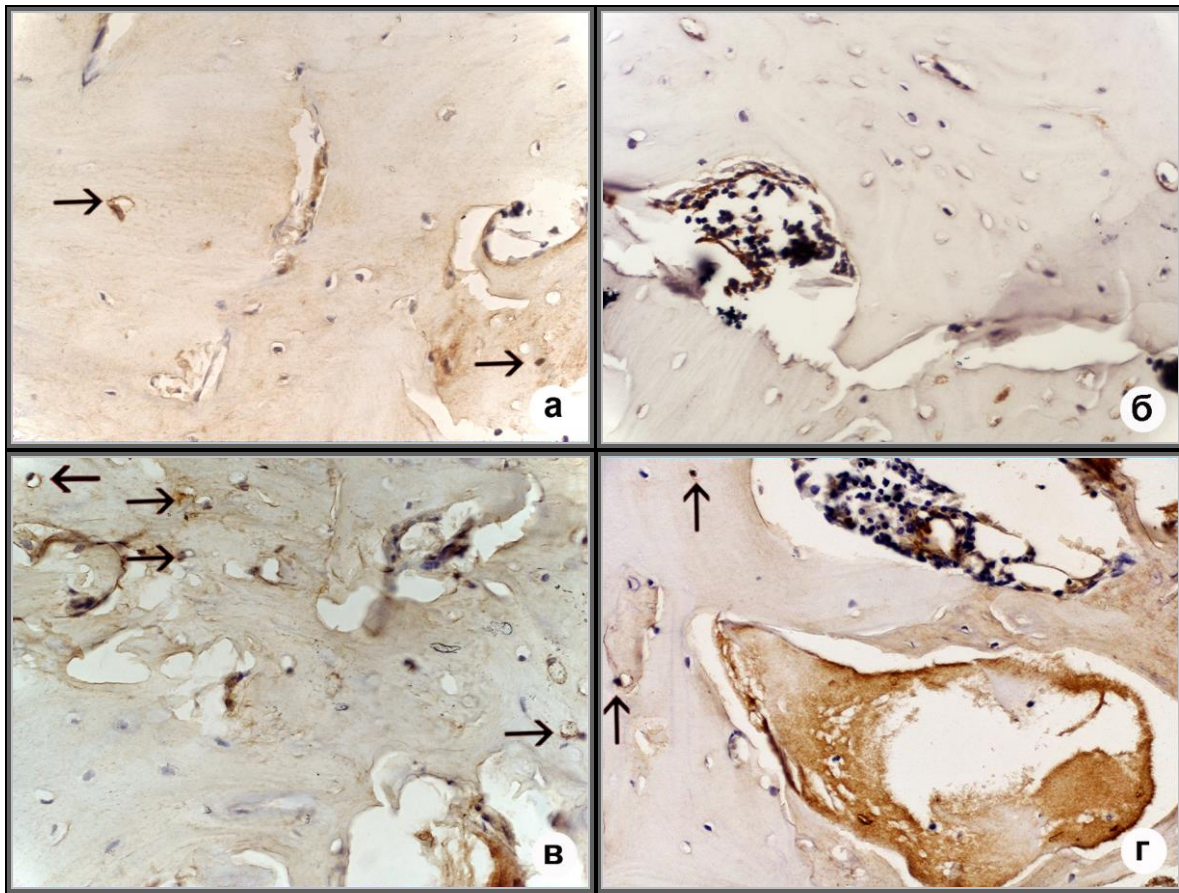
Имуоекспресија остеопонтин у дефекту експерименталних и контролних група приказана је на **Слици 27а-г**. У свим групама, након периода регенерације од осам недеља, се уочава слаба позитивност ћелија у калусу.

Ретке позитивне ћелије се могу наћи на местима ремоделације као и близу нересорбованих ММК партикула у АЦ и ХЦ групи (**Слике 27б и 27г**).

У СР групи се могу уочити ретке, најчешће појединачне ћелије распоређене углавном близу ивице калуса (**Слика 27а**).

Везивно ткиво у калусу СЦ групе показује умерену експресију остеопонтин (**Слика 27б**) што је карактеристично и за одређен број ћелија везивног ткива АЦ групе које према приказаној слици насељавају партикуле ММК (**Слика 27г**).

Присуство још увек нересорбованих и слабо насељених партикула ММК у дефекту АЦ групе је много заступљеније. Остеопонтин је експримиран и у остеоцима СЦ групе (**Слика 27б**).



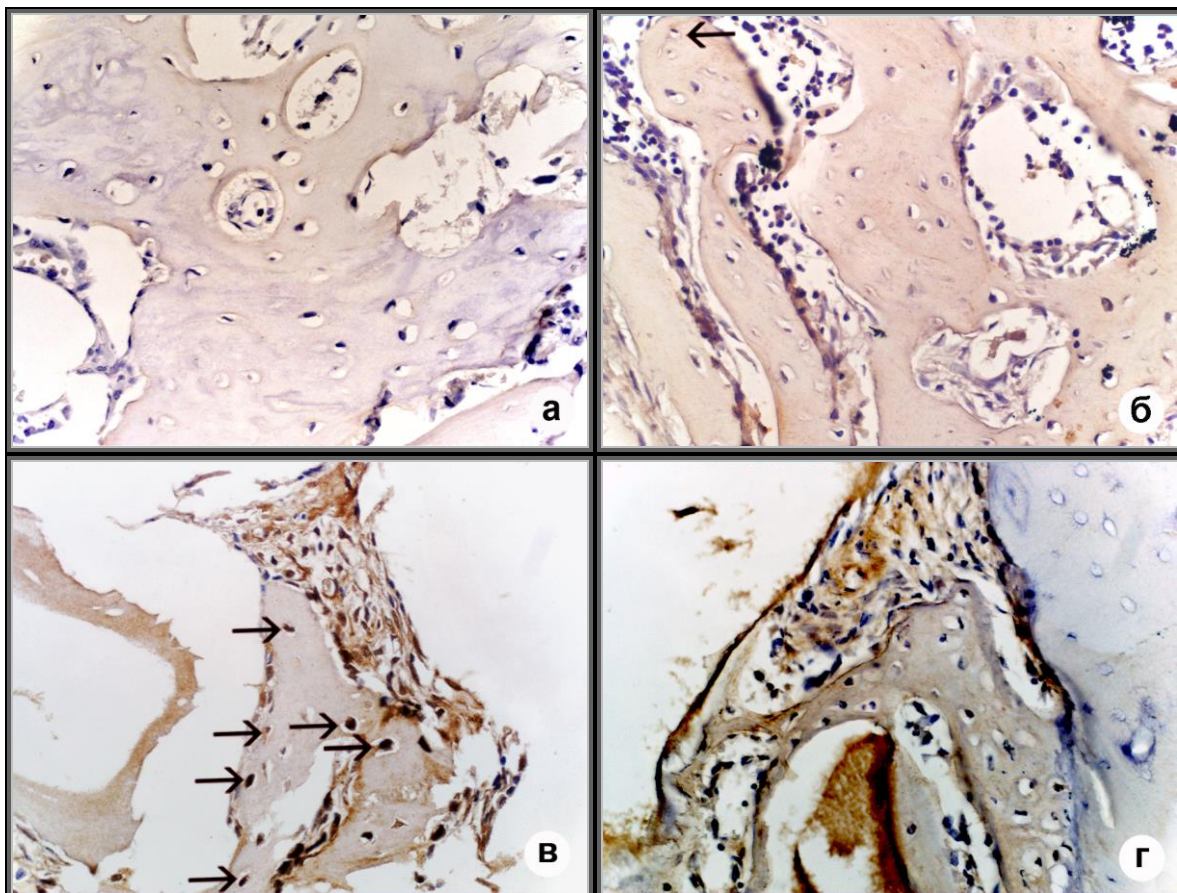
**Слика 27.** Имуноекспресија остеопонтина у дефектима код остепоротичних пацова из испитиваних група након периода регенерације од осам недеља; а – СР група, б – СЦ група, в – ХЦ група, г – АЦ група. (x400); стрелице – позитивне ћелије у калусу



#### 4.2.3.2. Osteocalcin у месту дефекта

##### 4.2.3.2.1. Период регенерације од две недеље

Имуноекспресија остеокалцина након периода регенерације од две недеље приказана је на Слици 28а-г.



**Слика 28.** Имуноекспресија остеокалцина у дефектима код остепоротичних пацова из испитиваних група након периода регенерације од две недеље; а – СР група, б – СЦ група, в – ХЦ група, г – АЦ група. (x400); стрелице – ћелије у лакунама налик на остеоците које су позитивне на остеокалцин

Интензивно бојење на ОС, неколагени протеин матрикса синтетисан од стране остеобласта и остеоцита, се може видети у ћелијама које окружују трабекуле у дефекту АЦ групе и ХЦ групе (Слике 28в и 28г).

Умерена до блага експресија ОС карактеристична је за ћелије око трабекула СЦ групе, док сам калус показује ретке ћелије у лакунама које су позитивне на ОС (**Слика 28б**). У СР групи се може уочити разноврсна слика у зависности од дела калуса који се посматра. Ћелије у лакунама трабекула могу бити благо позитивне или негативне, док је експресија ОС у околном везивном ткиву слаба. У месту дефекта се на појединим местима може видети изостанак имуноекспресије ОС (**Слика 28а**).

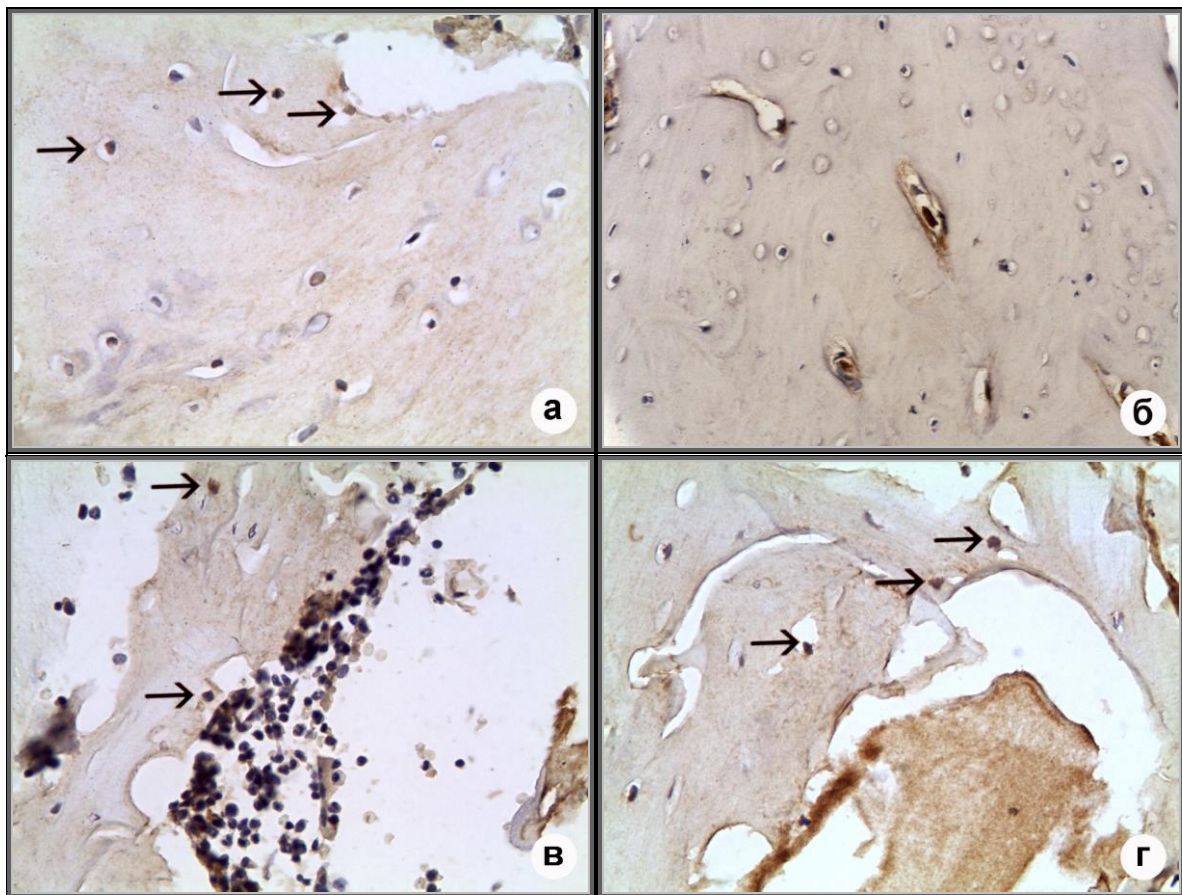
У ХЦ групи пацова, изражена експресија ОС је нађена и у остеобластима и у ћелијама које су заробљене у лакунама калуса, налик на остеоците (**Слика 28в**). У АЦ групи се види углавном позитивност остеобласта, док су ћелије у лакунама негативне или благо позитивне на ОС (**Слика 28г**).

#### *4.2.3.2.2. Период регенерације од осам недеља*

Имуноекспресија остеокалцина у месту дефекта испитиваних група након периода регенерације од осам недеља приказана је на **Слици 29 (а-г)**.

Остеокалцин показује слабу имуноекспресију у калусу свих група након осам недеља регенерације. Експресија се углавном може видети на местима ремоделације услед повећане активности остеобласта као и у остеоцима.

На сликама СР групе се могу видети благо позитивне ћелије уз стару кост и око непотпуно рестаурираних ремоделационих јединица (**Слика 29а**). У дефектима СЦ групе, интензивнија експресија је забележена у остеоцима (**Слика 29б**).



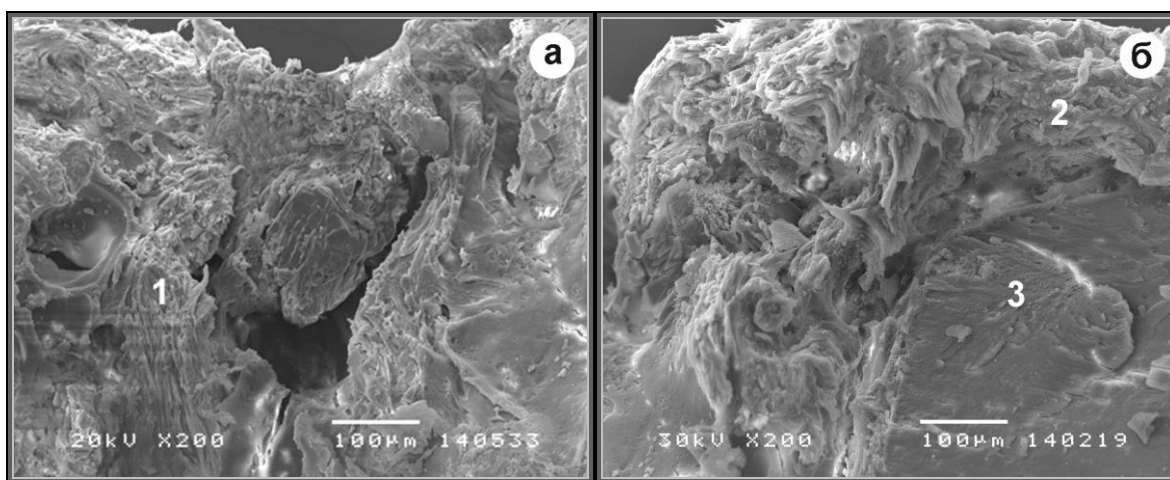
**Слика 29.** Имуноекспресија остеокалцина у дефектима код остепоротичних пацова из испитиваних група након периода регенерације од осам недеља; а – СР група, б – СЦ група, в – ХЦ група, г – АЦ група. (x400); стрелице – ћелије у лакунама налик на остеоците које су позитивне на остеокалцин

Ћелије које се налазе уз трабекуле новоформиране кости у ХЦ групи показују умерену експресију остеокалцина (Слика 29в). И у самим трабекулама које су у области костне сржи могу уочити ретке позитивне ћелије (Слика 29в). У дефекту АЦ групе се, такође, уочава позитивност ћелија у трабекуларној кости која је настала у области костне сржи и то углавном око партикула ММК и на граници са старом кости (Слика 29г), док је, као и код ХЦ групе, експресија у новоформираној компактној кости на периферији дефекта, слаба.

#### 4.2.4. СЕМ анализа дефеката у остеопоротичној кости

##### 4.2.4.1. Дефект након периода регенерације од две недеље

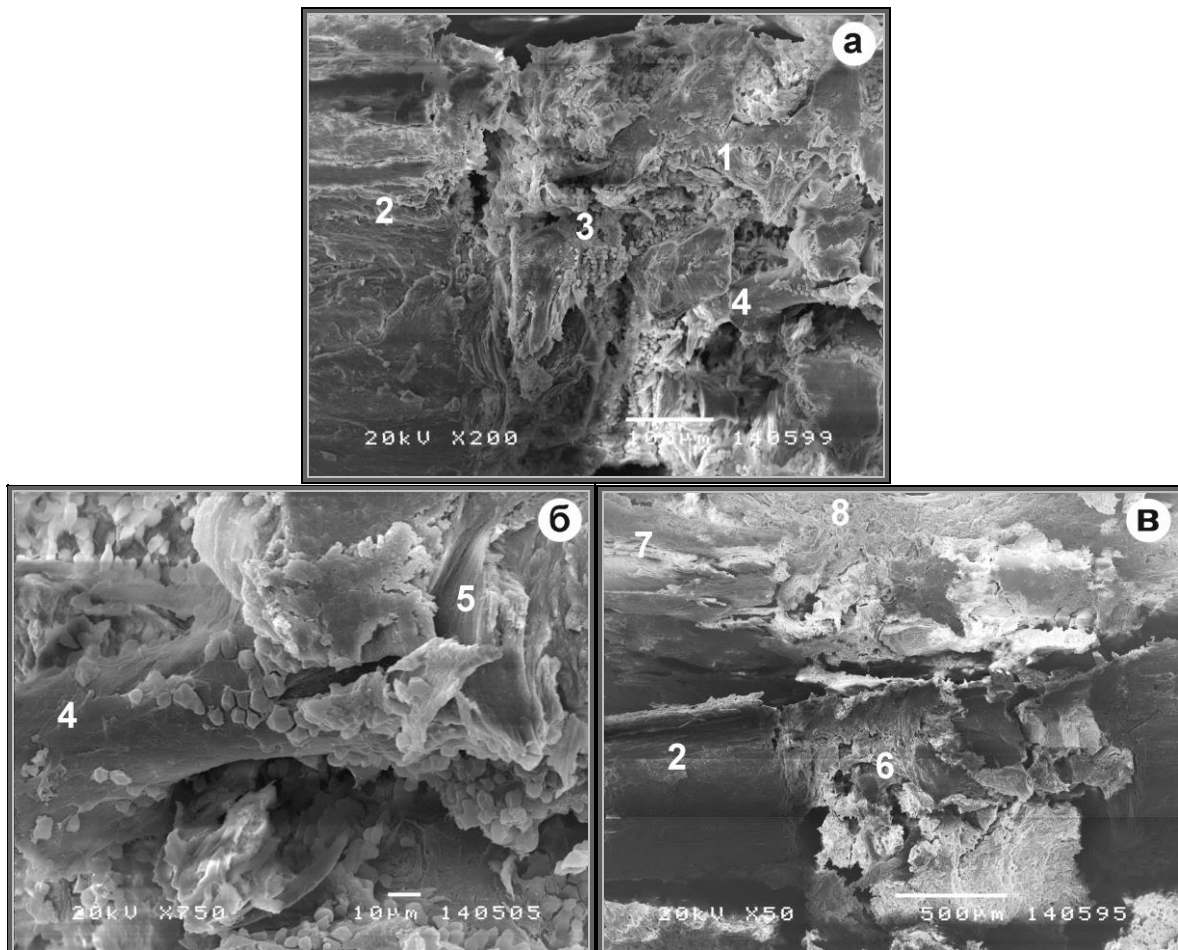
Место дефекта у СР групи пацова након периода регенерације од две недеље је приказано на **Слици 30**. Новоформиран калус у дефекту је изграђен из трабекула које окружују шупљине испуњене везивним ткивом и могу се уочити на левој страни **Слике 30а**.



**Слика 30.** СЕМ микрографије дефекта у СР групи оваријектомисаних пацова након периода регенерације од две недеље; а) општи изглед дефекта; б) спуштање спољашњег калуса у место дефекта; 1 – калус у дефекту; 2 – спољашњи калус; 3 – стара остеопоротична кост;

На појединим местима се може видети присуство опиљака старе кости који су се задржали након прављења дефеката. Новоформиран спољашњи калус се може видети на **Слици 30б**, као и његово спуштање у место дефекта и где се спаја са унутрашњим калусом.

Место дефекта код пацова из СЦ групе приказано је на **Слици 31**. Са **Слике 31а** се може видети да место дефекта испуњава велики број трабекула новоформиране кости које су окружене ћелијама везивног ткива.



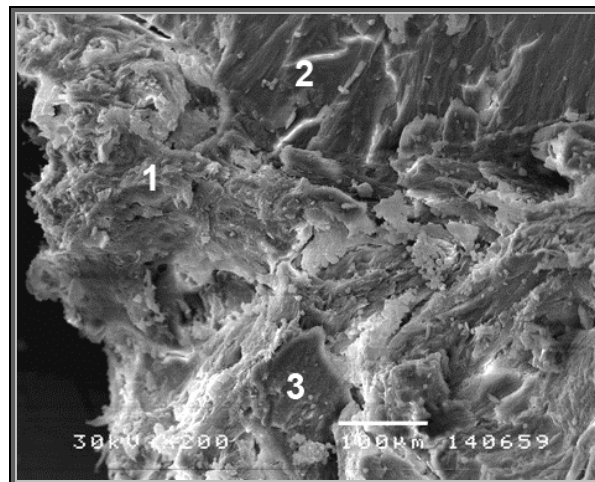
**Слика 31.** СЕМ микрографије дефекта у СЦ групи оваријектомисаних пацова након периода регенерације од две недеље; а) општи изглед дефекта; б) колонизирани партикуле биоматеријала; в) спољашњи калус и фиброза; 1 – калус у дефекту (трабекуле новоформиране кости); 2 – стара остеопоротична кост; 3 – везивно ткиво између трабекула и биоматеријала; 4 – партикуле ММК; 5 – калус који замењује партикуле ММК; 6 – место дефекта; 7 – спољашњи калус; 8 – фиброза.

Партикуле ММК се према структури могу разликовати од новоформираног калуса. На појединим местима се може уочити да се калус претежно формира око и у

близини партикула ММК. Колонизиране партикуле биоматеријала се могу видети на **Слици 31б**.

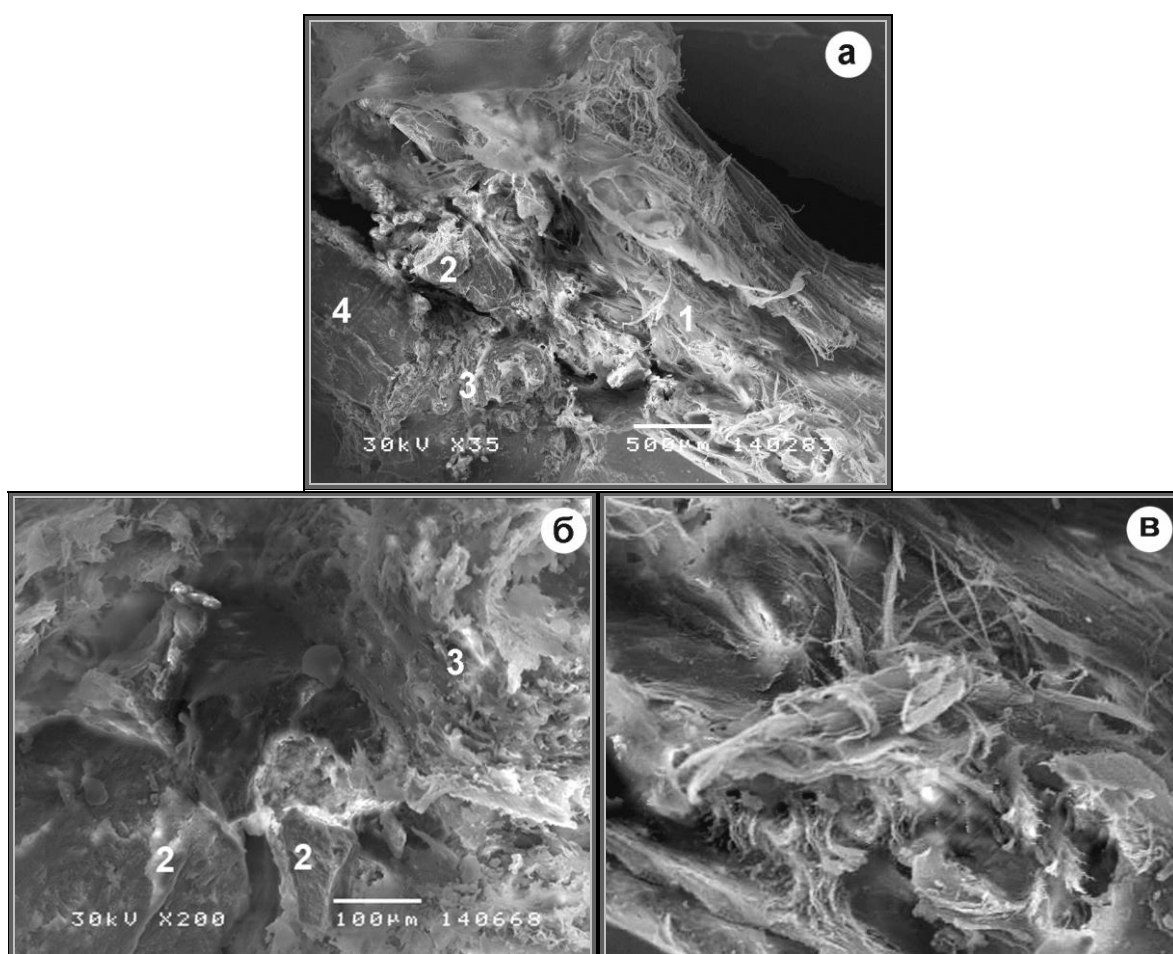
**Слика 31в** показује добро развијен спољашњи калус који је вероватно настао активношћу камбијалног слоја периоста. На истој слици се може видети и фиброза која покрива цело место дефекта.

На **Слици 32** приказано је место дефекта код животиња из ХЦ групе. Микрографија приказује део старе кости покривен новоформираним спољашњим калусом који се спаја са калусом насталим у месту дефекта. Присуство великог броја ћелија као и партикула ММК које су уроњене у новоформирану калус се може видети на приказаној слици.



**Слика 32.** СЕМ микрографија дефекта у ХЦ групи оваријектомисаних пацова након периода регенерације од две недеље; 1 – новоформиран калус; 2 – стара остеопоротична кост; 3 – партикуле ММК.

Место дефекта код животиња из АЦ групе приказано је на **Слици 33** и карактерише се малом количином новоформиране кости (калуса) и великим бројем празнина које су вероватно испуњавале партикуле ММК које су отпале приликом обраде узорка због слабе интеграције (**Слика 33а и 33б**).



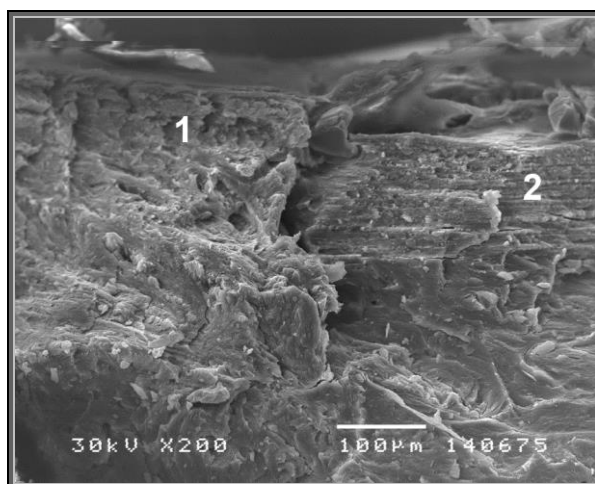
**Слика 33.** СЕМ микрографије дефекта у АЦ групи оваријектомисаних пацова након периода регенерације од две недеље; а) општи изглед дефекта са околном грануломатозном реакцијом; б) калус у централном делу дефекта АЦ групе окружен партикулама ММК; в) мултинуклеарна гигантска ћелија; 1 – грануломатозна реакција; 2 – партикуле ММК; 3 – калус у месту дефекта; 4 – стара остеопоротична кост;

У централном делу дефекта, између партикула биоматеријала, се може уочити формирање унутрашњег калуса (Слика 33б), док се присуство спољашњег калуса једва уочава (Слика 33а).

На површини калуса, изван места дефекта, може се видети добро развијена грануломатозна реакција (Слика 33а) са мултинуклеарним гигантским ћелијама (Слика 33в). Ове ћелије су углавном обле или издужене, са крупним овалним једрима и уочавају се око партикула биоматеријала.

#### 4.2.4.2. Дефекти након периода регенерације од осам недеља

На **Слици 34** је представљено место дефекта код животиња из СР групе. Микрографија приказује део старе и нове кости као и границу између ова два одељка. За разлику од ламеларне структуре која карактерише стару кортикалну кост, нова кост показује организацију која подсећа на вртложну кост са крупним шупљинама које указују на њену порозну структуру.

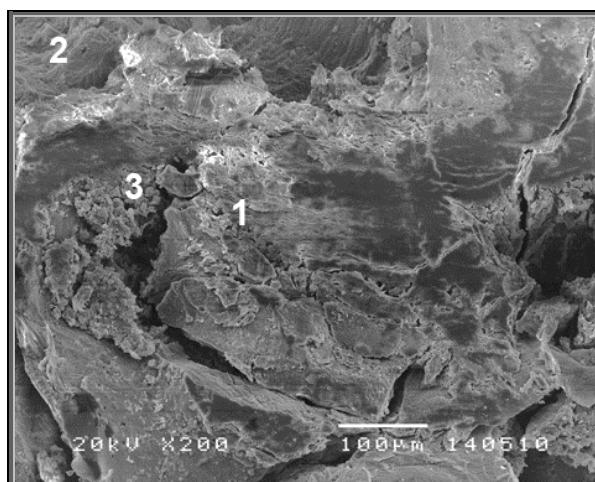


**Слика 34.** СЕМ микрографија дефекта у СР групи оваријектомисаних пацова након периода регенерације од осам недеља; 1 – нова кост; 2 – стара остеопоротична кост

Граница између околне остеопоротичне кости и нове кости је у виду пукотине у којој се не уочава присуство хелија нити синтезе коштаног матрикса.

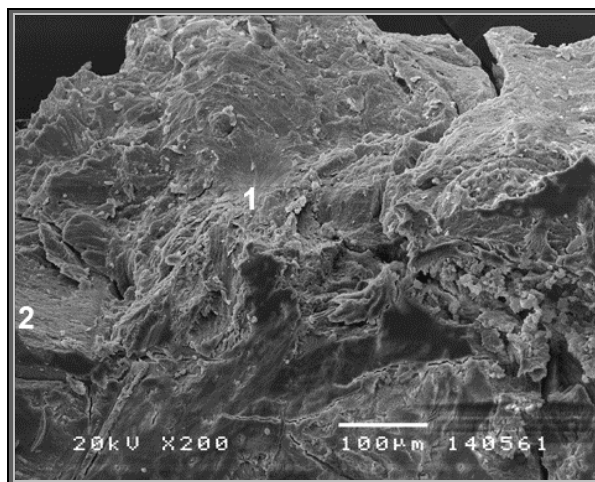
СЕМ микрографија дефекта животиња из СЦ групе приказана је на **Слици 35**. Стара кост, нова кост, и присуство везивног ткива у месту дефекта су структуре које се јасно разликују на микрографији. Поред тога, уочљиве су и разлике у структури нове кости које омогућавају разликовање младе, незреле кости (светлије боје) која је окружена зрелом, ламеларном кости (тамније боје) што се поклапа са структуром виђеном на хистолошким пресецима. Унутар калуса често се могу уочити и накупине везивно-ткивних хелија. У централном делу слике поред накупина везивно-ткивних хелија се може уочити партикула биоматеријала са ресорпционим лакунама (место ресорпције биоматеријала).





**Слика 35.** СЕМ микрографија дефекта у СЦ групи оваријектомисаних пацова након периода регенерације од осам недеља; 1 – нова кост; 2 – стара остеопоротична кост; 3 – ћелије везивног ткива у месту дефекта

Место дефекта код животиња из ХЦ групе приказано је на **Слици 36**. У њему се може видети велика површина нове кости са претежно вртложном структуром док се у неким деловима могу уочити и слабо изражене ламеле.

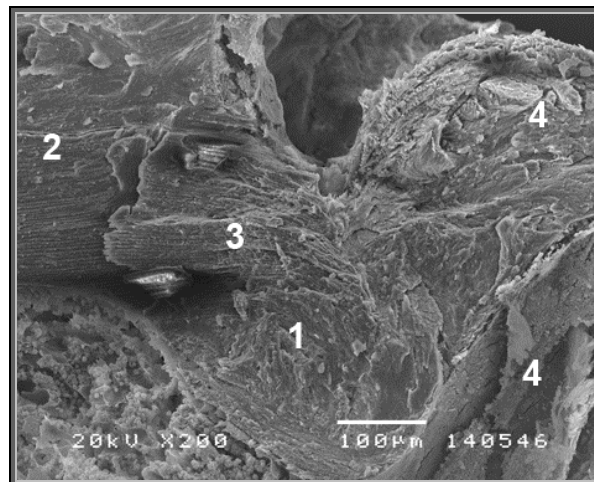


**Слика 36.** СЕМ микрографија дефекта у ХЦ групи оваријектомисаних пацова након периода регенерације од осам недеља; 1 – нова кост; 2 – стара остеопоротична кост;

Дефект направљен у фемуру животиња АЦ групе приказан је на **Слици 37**. Поред слабо уочљиве границе између околне остеопоротичне кости и новоформираног

калуса, микрографија јасно осликава и структуру новоформиране кости настале под утицајем алфакалцидола. Нова кост у појединим деловима показује јако изражену ламеларну структуру. На неким местима се може уочити још увек млада, незрела кост (светлије боје), која показује одличну интеграцију са новом, зрелом кости.

Оно што карактерише место дефекта у АЦ групи је и присуство „тунела“ који представљају место биоматеријала који још увек није ресорбован али је приликом обраде отпао са препарата. На појединим местима су се задржале интегрисане мање партикуле биоматеријала и оне се такође могу уочити на приказаној слици. Граница између околне остеопоротичне кости и нове кости не представља просту пукотину већ калус налаже на околну кост и са њом показује одличну интеграцију.



**Слика 37.** СЕМ микрографија дефекта у АЦ групи оваријектомисаних пацова након периода регенерације од осам недеља; 1 – нова кост; 2 – стара остеопоротична кост; 3 – ламеле у новој кости; 4 – партикуле или место партикула ММК;

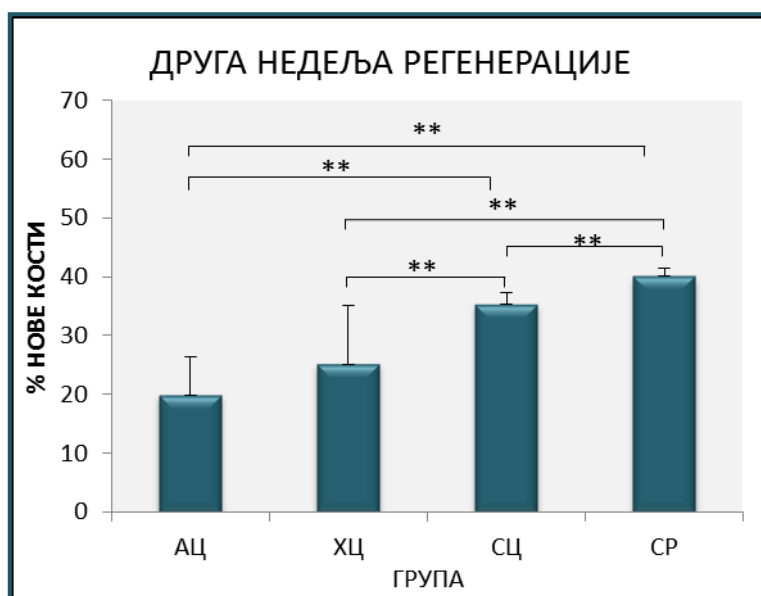
#### 4.2.5. Хистоморфометријска анализа дефекта

##### 4.2.5.1. Хистоморфометријска анализа новоформиране кости у дефекту

###### 4.2.5.1.1. Период регенерације од две недеље

Количина новоформиране кости у дефектима експерименталних и контролних група пацова након периода регенерације од две недеље, приказана је на **Графику 10**.

Као што се може видети и на хистолошким сликама, хистоморфометријска анализа показује да се све групе, осим АЦ и ХЦ групе, значајно разликују међу собом у количини нове кости у дефекту након периода регенерације од две недеље.

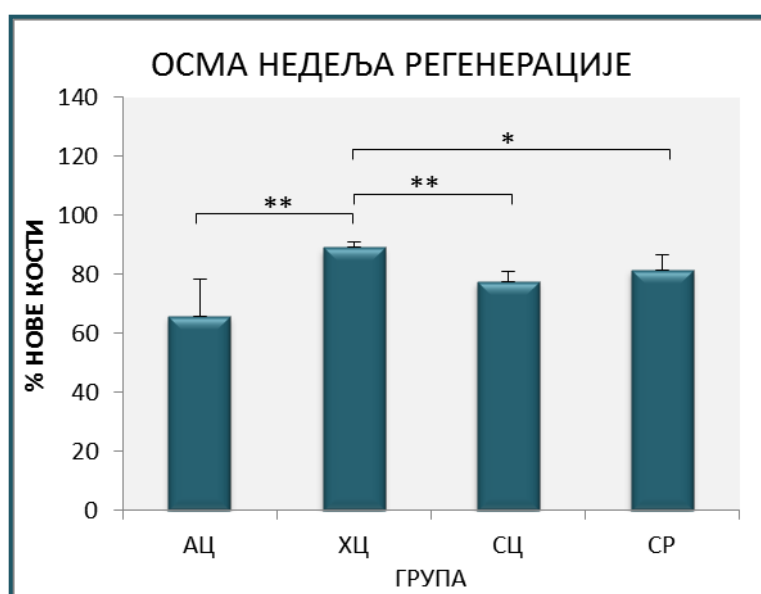


**График 10.** Процент новоформиране кости у дефекту након периода регенерације од две недеље (\*\*P < 0.01)

Највећа количина новоформиране кости након периода регенерације од две недеље добијена је у СР групи док је најмања количина кости добијена у АЦ групи. У ХЦ групи је забележена нешто већа количина настале кости у односу на АЦ групу али добијене разлике нису статистички значајне.

4.2.5.1.2. Период регенерације од осам недеља

Количина новоформиране кости у дефектима експерименталних и контролних група након периода регенерације од осам недеља приказана је на **Графику 11**. На крају експерименталног периода, најмање нове кости је добијено у АЦ групи, док је највећа количина кости измерена у дефекту ХЦ групе. Разлика у количини новоформиране кости између ове две групе је статистички значајна ( $P < 0.01$ ).



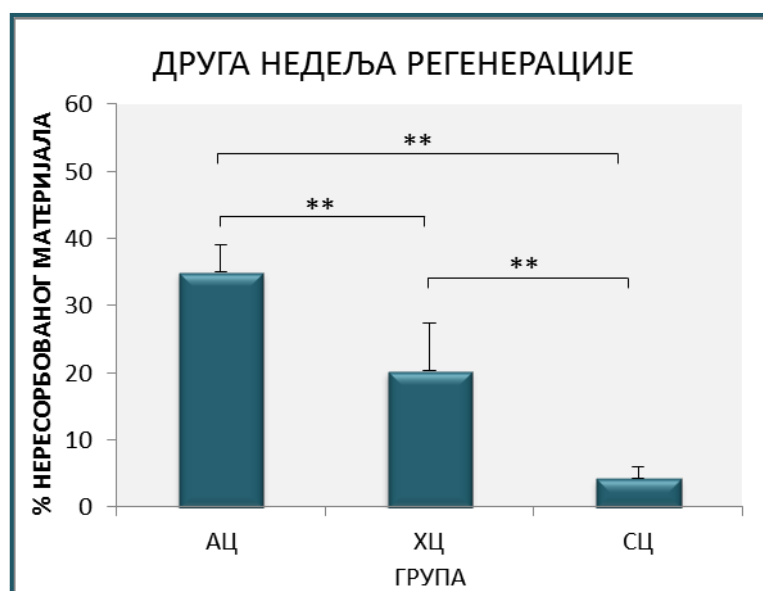
**График 11.** Процент новоформиране кости у дефекту након периода регенерације од осам недеља (\*\*  $P < 0.01$  \*  $P < 0.05$ )

ХЦ група се по количини нове кости у дефекту статистички значајно разликује и од СЦ ( $P < 0.01$ ) и СР групе ( $P < 0.05$ ) с тим што је статистичка значајност у поређењу са СЦ групом већа, због мање количине новостворене кости у односу на СР групу. СЦ и СР група се не разликују значајно међу собом као ни у поређењу са АЦ групом.

#### 4.2.5.2. Хистоморфометријска анализа нересорбованог материјала у дефекту

##### 4.2.5.2.1. Период регенерације од две недеље

Процент преосталог материјала у дефекту експерименталних и контролних група након периода регенерације од две недеље приказан је на **Графику 12**. Све групе се статистички значајно разликују међу собом при чему је највећа количина нересорбованог материјала измерена у АЦ групи, док је најмања количина материјала измерена у СЦ групи. Статистичка значајност између група износи  $P < 0.01$ .

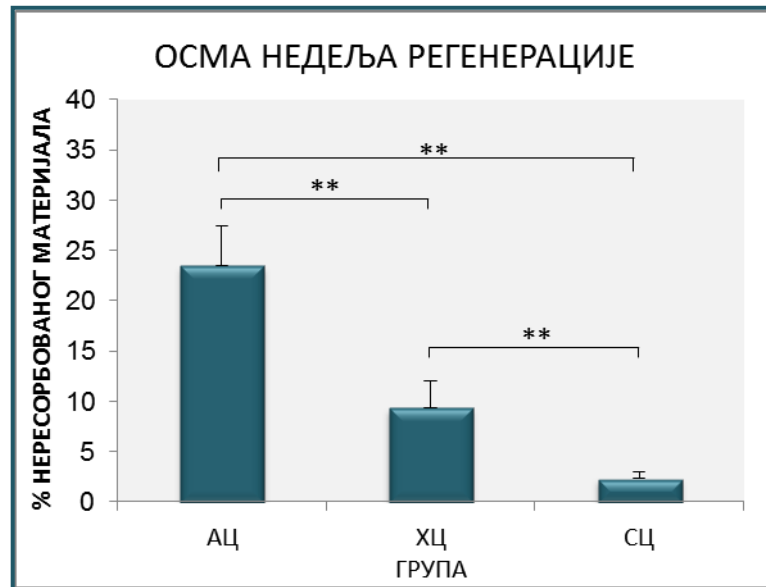


**График 12.** Процент нересорбованог материјала у дефекту након периода регенерације од две недеље (\*\* $P < 0.01$ )

##### 4.2.5.2.2. Период регенерације од осам недеља

Количина преосталог материјала у дефекту експерименталних и контролних група након периода регенерације од осам недеља приказана је на **Графику 13**. На крају експерименталног периода, највише нересорбованог материјала у дефекту је

остало у АЦ групи док је СЦ група показала најмању количину преосталог материјала у дефекту.



**График 13.** Процент нересорбованог материјала у дефекту након периода регенерације од осам недеља (\*\* $P < 0.01$ )

У ХЦ групи је нађена значајно мања количина преосталог материјала у дефекту у односу на АЦ групу док је, с друге стране, ова количина значајно већа у односу на СЦ групу. Све три групе се разликују међу собом са статистичком значајношћу  $P < 0.01$ .

## **5. ДИСКУСИЈА**

Зарастање остеопоротичних фрактура и дефеката заузима посебно место у проблематици прелома. Компромитована чврстина остеопоротичне кости је узрок повећаног броја неуспелих фиксација фрактура, док њен смањен биолошки капацитет доводи до проблема са осеоинтеграцијом имплантата и несрастањем (Strømsøe, 2004; Alghamdi и сар., 2014). Остеопоротични услови који су довели до настанка прелома присутни су и током њиховог зарастања што може да доведе до промена у регенерацији у односу на здраву кост. Из ових разлога се процес регенерације кости у остеопоротичним условима треба сагледавати као потпуно нов проблем који захтева вишеструки приступ.

У клиничкој пракси је, код пацијената који болују од остеопорозе, пожељна употреба анаболичких или анти-катаболичких лекова у комбинацији са коштаним заменицима, како би се стимулисала изградња кости и ојачало место прелома. Познавање утицаја анти-остеопоротичних лекова на процес зарастања фрактура је од велике важности за одабир адекватне терапије која ће се користити за њихово лечење (Johnson-Lynn и сар., 2008; Goldhahn и сар., 2010; Lyritis, 2010; Giannotti и сар., 2013).

Витамин Д и његови аналози се успешно користе у превенцији и третману остеопорозе због утицаја на минерализацију кости која доприноси њеној чврстини и тиме смањује ризик за настанак могућих прелома (Lau и Baylink, 1999; Nordin и сар., 1999; Ringe и сар., 2004; Ringe и Schacht, 2004). У експериментима на остеопоротичним моделима животиња, они су показали ефекат на очување кости, смањујући њену разградњу уз одржавање или стимулацију процеса њеног формирања. Хормоналне форме витамина Д, као што је алфакалцидол, су оствариле већи учинак на овом пољу истраживања (Shiraishi и сар., 1999; Shiraishi и сар., 2000; Saito и сар., 2010).

Ова докторска дисертација се бави зарастањем дефеката у остеопоротичној кости под утицајем локално примењених имплантата на бази витамина Д у комбинацији са минералним матриксом кости (ММК) и PRP-ем. Ефекат витамина Д и његових метаболита на зарастање остеопоротичне кости је углавном испитиван након њихове оралне администрације (Fu и сар., 2009; Saito и сар., 2010). Досадашња истраживања су показала да активне форме витамина Д делују дозно зависно на кост као и да је забележен већи ефекат на формирање кости коришћењем високих концентрација овог витамина (Erben и сар., 1997; Erben, 2001). Системска апликација високих доза витамина Д врло често доводи до појаве хиперкалцемије због чега је



његова терапеутска употреба у својству анаболичког лека, ограничена. Начин да се добије одговарајући одговор коштаног ткива и избегне могућност настанка хиперкалцемије у случају коришћења витамина Д, је његова локална достава у место дефекта која укључује и примену биоматеријала као носача лека. Због могућности да се локално активирају у коштаном ткиву (Howard и сар., 1981; Ichikawa F, 1995) као и да делују директно на ћелије кости везујући се за своје рецепторе (Morris и Anderson, 2010), витамин Д и његови аналози би могли да буду потенцијални агенси за локално лечење остеопоротичних фрактура и дефеката.

Коришћење локалних система за доставу различитих анаболичких и анти-остеопоротичних лекова је у новије време постао популаран приступ којим се постиже бржи одговор коштаног ткива, боља осеоинтеграција имплантата и избегавају нежељени ефекти системских третмана високим дозама (Lerner, 2006; Vobyn и сар., 2009; Alghamdi и сар., 2014; Kyllönen и сар., 2015).

С обзиром да остеопороза није болест карактеристична за животиње, у циљу испитивања зарастања дефеката у остеопоротичној кости потребно је било направити адекватан експериментални модел остеопорозе на пацовима са којим би се даље манипулисало, а који ће симулирати услове присутне у остеопорози код жена. На основу досадашње литературе, може се закључити да су подаци о ефектима овариектомије код женки пацова врло разноврсни. Студије показују да се ефекти овариектомије мењају са временом протеклим од операције, као и да умногome зависе од соја, старости, исхране и дела скелета пацова који се посматра (Jee и Yao, 2001; Turner и сар., 2001; Johnston и Ward, 2015). Због тога је, у зависности од сврхе у коју ће се користити направљени модел, унапред потребно прецизно дефинисати услове који ће довести до развоја жељених карактеристика код животиња.

Како би овариектомисани пацов био погодан модел за праћење зарастања дефеката под утицајем испитиване терапије, потребно је било да се потврде остеопоротични услови као и последице овариектомије на дистални део фемура у коме ће се креирати дефекти. С тим у вези, један од циљева докторске дисертације био је да се на основу усаглашености праћених ендокринолошких, биохемијских и радиолошких параметара утврди најпогоднији период након овариектомије за праћење процеса зарастања дефеката у дисталном делу фемура пацова *Wistar* соја.

Модел овариектомисаног пацова коришћен у овој дисертацији је лако поновљив и у досадашњим истраживањима се показао као погодан за праћење тока болести као и одговора животиње на терапију (Thompson и сар., 1995; Lelovas и сар., 2008). Билатералном овариектомијом се искључује могућност стварања естрогена од стране оваријума чиме се, бар за одређени временски период, смањује ниво овог хормона у серуму.

Резултати дисертације добијени анализом естрадиола у серуму показују да је до значајног смањења његове концентрације дошло три месеца након хирушког уклањања јајника, као и да се ова ниска концентрација естрадиола одржава и у четвртм месецу након овариектомије. Ово потврђује успешност хирушке процедуре и указује на временски период потребан да се код пацова *Wistar* соја концентрација естрадиола значајно смањи и направи стање које симулира постменопаузну остеопорозу.

Добијени резултати су били полазна основа за даље извођење експеримената из теме дисертације, јер су обезбедили информације о појави и трајању тзв. остеопоротичних услова, неопходних за праћење зарастања дефеката у остеопорози. У другим студијама, истраживања на овариектомисаним моделима пацова *Wistar* соја су рађена три и четири месеца након овариектомије (Andrade и сар., 2013; Al-Sherbini и сар., 2014), мада постоје и експерименти који су спроведени и већ након месец дана од операције (Canettieri и сар., 2009) Студије које су користиле пацове соја *Sprague-Dawley* показале су брже опадање концентрације естрогена које је забележено у првом месецу након овариектомије (Davidge и сар., 2001; Zhao и сар., 2005; Shin и сар., 2012; Kim и сар., 2014).

Резултати ове дисертације такође показују да постоје почетне флукуације у нивоу естрадиола које подразумевају и његово благо увећање, забележено два месеца након овариектомије. Овако добијени резултати могу да указују на тежњу организма да одржи хомеостазу након уклањања основног извора естрогене синтезе. Након забележених флукуација, концентрација естрадиола у серуму је након три месеца имала значајно ниже вредности, како у односу на контролну групу исте старости, тако и у односу на ниво естрадиола који је измерен у почетна два месеца.

Добијена почетна осцилирања концентрације естрадиола, као и забележен благи, али не и статистички значајан пораст након четвртог месеца, се могу објаснити преузимањем синтезе естрогена од стране екстрагонадалних места (Brodie, 1991;

Simpson и сар., 1999; Simpson, 2000; Nelson и Bulun, 2001; Simpson и Davis, 2001; Simpson, 2003) процесом екстрагонадалне ароматизације коју је објаснио Simpson (2000). Овај процес подразумева способност екстрагонадалних ткива да конвертују андрогене прекурсоре из надбубрежне жлезде у естроген. Истраживања су показала да субкутано абдоминално масно ткиво, јетра и надбубрежне жлезде доприносе повећању концентрације циркулишућег естрогена након овариектомије, са биолошким циљем да се организму обезбеди довољна концентрација неопходног хормона (Zhao и сар., 2005). Ове концентрације нису високе, и не мењају се циклично као што је то случај са интактним животињама (Zhao и сар., 2004). Ипак је, приликом прављења остеопоротичног модела, пожељно смањити могућност ових потенцијалних извора естрогене синтезе, пре свега масног ткива, да повећају системску концентрацију хормона и тиме умање ефекте овариектомије на кост.

Како би, у нашој студији, спречили претерану акумулацију масног ткива и добијање на маси које је повезано са овариектомијом (Gale и Sclafani, 1977), пацове смо хранили оном количином хране коју су интактне животиње конзумирале у року од 24 часа (Davidge и сар., 2001). Овариектомисани пацови показују мало већи пораст масе током испитиваног периода у односу на контролне пацове исте старости. Због варирања масе животиња које припадају истој групи, ове разлике се не сматрају статистички значајним. Такође се може уочити и правилан пораст масе код овариектомисаних пацова какав се може видети и у контролној групи животиња. Резултати дисертације који показују промене у маси овариектомисаних и лажно оперисаних животиња, у периоду након овариектомије или лажне операције, указују на добро избалансирану исхрану овариектомисаних животиња коришћених у експерименту која не доводи до претеране акумулације масног ткива које би представљало потенцијални извор естрогена.

Маркери коштаног метаболизма показују велику осетљивост на промене концентрације естрогена. Да би се уочио ефекат овариектомије на коштани промет, упоређиване су вредности ALP, AP, Ca и P добијене у групи овариектомисаних и одговарајућих лажно оперисаних животиња, након истог временског периода протеклог од операције.

Добијени резултати показују да концентрације Ca и P у серуму овариектомисаних животиња показују ниже вредности током једног дела

експерименталног периода. Фосфор је показао велику остетљивост на овариектомију и његова концентрација у серуму је снижена у другом месецу након операције, док је пад концентрације Са код овариектомисаних пацова забележен у четвртом месецу, тек након великог пада концентрације естрогена.

Снижене вредности једног или оба минерала су карактеристичне за период након овариектомије и забележене су и у другим студијама (Saleh и Saleh, 2011; Liu и сар., 2014; Seif, 2014). До смањења концентрације Са и Р у крви долази услед слабије интестиналне апсорпције узроковане недостатком естрогена (Gennari и сар., 1990; O'Loughlin и Morris, 1998) и повећаног излучивања калцијума и фосфора које је повезано са стањем остеопорозе (Dick и сар., 2005). Резултати дисертације показују да после трећег месеца од урађене овариектомије постоји нарушена хомеостаза оба минерала.

ALP и AP представљају ензиме присутне у многим ткивима али је њихова активност великим делом везана за кост. Повишене вредности маркера коштаног метаболизма, ALP и AP, у почетним месецима након овариектомије, могу да указују на убрзан коштани промет, настао услед флукуација нивоа естрадиола. С обзиром да је концентрација естрадиола мерена на сваких месец дана од овариектомије, као и да су у почетном периоду забележени и тренуци њеног благог пораста, може се претпоставити да је између два периода мерења такође долазило до промена концентрације које нису забележене, али су узроковале промене у биохемијским параметрима. Повећан ниво активности киселе фосфатазе забележен месец дана и два месеца након урађене овариектомије, показује да је на вероватније прво дошло до промена у ресорпцији кости. Повећана активност остеокласта последично доводи до повећане активности остеобласта, јер су процес разградње и формирања кости удружени у сложеном процесу коштаног ремоделирања (Rahnama и Swiatkowski, 2002). Као последица активације остеобласта, долази до увећања нивоа алкалне фосфатазе, два месеца након овариектомије. Овакав след догађаја након овариектомије код пацова *Wistar* соја се може видети и у студији *Rahnama u Swiatkowski* (2002). Слични резултати добијени су и на моделу пацова соја *Sprague-Dawley* (Zhang и сар., 2007).

Вредности ALP и AP добијене у овој студији остају повишене до краја експерименталног периода, иако ове разлике у односу на одговарајуће контролне групе после другог месеца не показују статистичку значајност. Њихов благи пад забележен у

односу на почетно значајно увећање концентрације је вероватно последица хомеостатских механизма који теже да смање брзину коштаног промета при чему се баланс између разградње и изградње кости успоставља на нивоу виших вредности у односу на контролне, лажно оперисане животиње. Пошто концентрација циркулишућег естрадиола код овариектомисаних пацова, без обзира на благи пораст, остаје током времена нижа од нормалне физиолошке (Zhao и сар., 2005) очекује се да ће вероватно узроковати флукуације у параметрима коштаног промета. На основу наших као и резултата других истраживача (Sigrist и сар., 2007; Zhang и сар., 2007) може се закључити да је до највећих промена у коштаном метаболизму дошло у почетним месецима након овариектомије док организам поново не успостави равнотежу, али на нивоу виших вредности, што је карактеристично за остеопоротично стање.

Познато је да губитак кости изазван овариектомијом код пацова зависи од времена протеклог након операције, као и од места на коме се густина процењује. У овој докторској дисертацији праћен је ефекат овариектомије на феморалну кост која је погодна за прављење дефеката и праћење њихове регенерације. На приказаном радиолошком снимку фемура животиња жртвованих након четири месеца од овариектомије је најпре уочено постојање ситних дефеката који се срећу код неких представника ове групе. Појава дефеката (микрооштећења) у дисталном делу фемура је карактеристична за пацијенте који болују од остеопорозе. Поправка оваквих ситних оштећења насталих у кости услед евентуалне смањене густине и нарушене микроархитектуре је отежана. У дисталном делу фемура се након четири месеца може уочити и благо увећање централне шупљине која је један од првих знакова остеопорозе изазване овариектомијом (Jee и Yao, 2001). Наведене промене су уочене тек након четвртог месеца, док кост овариектомисаних пацова није показивала разлике у односу на контролну групу у ранијим терминима жртвовања. Спонгиозна кост се не може уочити на радиолошким снимцима због слабе резолуције стоматолошког скенера.

Након што су на СТ снимцима, четири месеца након овариектомије, уочене промене у дисталном делу фемура, у овом делу кости је софтверски мерена густина како би се установио почетак уочених промена.

Резултати радиолошке анализе показују да је густина кости мерена у дисталном делу фемура три месеца након овариектомије први пут показала разлику у односу на

добијену густину код лажно оперисаних животиња. Након трећег месеца, промене густине су благе и забележене су само у спонгиозној кости, док су изражајније промене забележене након четвртог месеца од операције када је дошло до промена и у кортикалном делу волумена од интереса.

С обзиром на то да остеопороза првенствено оставља последице на спонгиозну кост (Brandi, 2009), добијене промене у густини кортикалног дела кости у четвртом месецу након овариектомије могу да указују на већ унапредовалу болест. Мања ширина кортикалне кости у остеопорози је у почетку резултат ендокортикалне ресорпције услед које долази до повећања централне шупљине. Касније долази до смањене густине овог дела кости због повећане порозности (Väänänen и Härkönen, 1996). С обзиром да кост пацова жртвованих четири месеца након овариектомије показује кортикално истањење и повећање централне шупљине у дисталном делу фемура, које се може видети на приказаним аксијалним пресецима, можемо претпоставити да је добијен резултат смањене густине дела волумена који заузима кортикална кост вероватно последица њеног истањења са унутрашње, ендокортикалне стране.

Густина спонгиозне кости је процењивана као укупна густина целог спонгиозног дела кости укључујући и трабекуле и просторе између њих због ограничења коришћене методе (мала резолуција скенера која не дозвољава разликовање структуре трабекула у спонгиозној метафизи). Смањена густина спонгиозне кости уочава се најпре у трећем, а затим и у четвртом месецу након овариектомије. До смањене густине спонгиозног дела кости након овариектомије може доћи услед смањеног броја трабекула, њиховог истањења, као и смањене густине (Väänänen и Härkönen, 1996). Што се тиче периоста, резултати густине показују да није забележена његова реакција у експерименталним групама која би евентуално довела до ојачања кости са спољашње стране чиме би се компензовао унутрашњи недостатак изазван ендокортикалном ресорпцијом.

Добијене промене у фемуру и период који је потребан да до њих дође су сличне са резултатима других студија које су показале да је 12 недеља оптимално време за уочавање промена у скелету пацова соја *Sprague-Dawley* (Johnston и Ward, 2015), који је чешће коришћен као остеопоротични модел. Овај период доста варира од дела скелета који се испитује. Без обзира на раније забележен пад нивоа естрогена код

пацова соја *Sprague-Dawley* у односу на сој *Wistar*, промене у фемуру се уочавају у приближно исто време код оба соја. Нека од истраживања показују да је потребно три месеца да дође до промена у дисталној метафизи фемура (Jiang и сар., 1997) и проксималној тибиви (Wronski и сар., 1988), месец дана у спонгиозној и 180 дана у кортикалној кости врата фемура (Li и сар., 1997), као и 180 дана у спонгиози слабинских пршљенова (Wronski и сар., 1989).

Промене на костима код оваријектомисаних животиња доследно прате промене у активности ALP и AP које су показале највише вредности у другом месецу након оваријектомије, при чему је овај убрзани коштани метаболизам вероватно довео до смањења коштане густине. Експериментална остеопороза потврђена је у овој докторској дисертацији три месеца након оваријектомисања пацова *Wistar* соја, на основу праћених параметара из крви и губитка коштане масе процењиване у дисталном фемуру оваријектомисаних животиња.

Циљ другог дела докторске дисертације био је испитати ефекте холекалциферола и алфакалцидола, локално апликованих у дефекте уз помоћ имплантата сачињених од ММК и PRP, на процес зарастања истих, направљених у фемуру остеопоротичног модела пацова. Упоредо са праћењем брзине остеогенезе, праћена је и ресорпција ММК партикула у дефекту и утицај витамина Д на карактеристике новоформираног калуса као што су микроархитектура, квалитет кости, ремоделација и интеграција са старом кости. Циљ је био и упоредити ефекте две форме витамина Д, међусобно, и у односу на контролне групе и на крају проценити да ли оваква комбинација носача и лека у имплантату може да има клиничку примену.

Место на коме је направљен коштани дефект у дисталном делу фемура представља погодно место на бутној кости, јер не омета кретање животиње нити захтева додатну фиксацију. Епифизна плоча раста се налази на довољној дистанци од циљаног места тако да интервенција не узрокује њен дисконтинуитет нити ремети нормалан физиолошки раст кости.

Дефект у фемуру је направљен пуном дубином кроз кортикалну кост што омогућава учешће мезенхимских ћелија костне сржи у процесу зарастања, њиховим диференцирањем у остеогене ћелије. Величина дефекта је сасвим довољна за испитивање карактеристика новоформираног калуса и праћење капацитета остеопоротичне кости да премости некритични дефект. Креирани дефекти су

остављени да спонтано зарастају или су испуњавани имплантатима сачињеним само од носача (ММК коме је додата PRP) или носача са испитивним формама витамина Д.

У нашој студији искоришћена је особина хидроксиапатита (НАр), који представља основну компоненту ММК, да са високим капацитетом адсорбује витамин Д (Ozeki и сар., 2008) због чега је минерални матрикс кости (*Bio-Oss*) коришћен као носач за холекалциферол и алфакалцидол и као скафолд за насељавање остеогених ћелија. Биоматеријали базирани на хидроксиапатиту се често користе у регенеративној медицини као коштани заменици сами, или као саставни делови имплантата, са циљем да потпомогну регенерацију кости, обезбеде примарну фиксацију и тиме ојачају преломљено место. Ово је нарочито битно када су у питању остеопоротичне фрактуре.

Како би се повећала остеоиндуктивност и остеокондуктивност ММК као и биолошки капацитет остеопоротичне кости, у овој дисертацији је минералном матриксу кости додата плазма обogaћена тромбоцитима. Овакав приступ се у ранијим студијама показао ефикасним приликом примене биоматеријала као заменика кости (Marx и сар., 1998; Hanna и сар., 2004; Okuda и сар., 2005; Intini и сар., 2007; Kanthan и сар., 2011; Roffi и сар., 2013). У регенеративној медицини, коришћење плазме обogaћене тромбоцитима је приступ који унапређује регенерацију кости захваљујући факторима раста који се ослобађају из активираних тромбоцита. Такође је познато да синергистичко деловање  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  и PRP стимулише остеогену диференцијацију адултних мезенхимских стем ћелија *in vitro* (Feng и сар., 2010).

Дозе витамина Д коришћене у експерименту су већ испитиване у ранијим студијама и показале су да имају стимулативне ефекте на изградњу кости за разлику од тестираних нижих доза (Erben, Scutt et al. 1997; Shiraishi, Takeda et al. 2000). Након имплантација, укључен је и постимплантациони тродневни третман региона дефекта високим дозама који је у студији Erben и сар. (1997) стимулисао изградњу кости након субкутане администрације. Постимплантациони третман је имао за циљ да обезбеди високу дозу витамина Д у месту дефекта док не почне разградња имплантата и његово отпуштање. Концентрација калцијума у крви пацова мерена је у моменту жртвовања и резултати су показали да локално примењене високе дозе испитиваних витамина не доводе до дугорочних промена у нивоу калцијума, односно да није утврђена хиперкалцемија, чиме је додатно оправдан примењени терапеутски приступ.



Добијени резултати дисертације показују да постоје јасне разлике у зарастању дефеката између експерименталних (витамин Д група) и контролних група. Такође, запажене су и значајне разлике у деловању холекалциферола и алфакалцидола на процес регенерације дефеката и карактеристике новоформиране кости. Добијене разлике се огледају у различитим ефектима на процес инфламације, брзину формирања калуса, степен ресорпције биоматеријала, количину формиране кости у дефекту као и у њеном квалитету.

Утицај локално допремљеног витамина Д и његових аналога на зарастање фрактура и дефеката у случају остеопорозе се ретко може наћи у литератури. Једна студија је показала позитиван утицај холекалциферола, након његове локалне доставе уз помоћ нанопартикула хидроксиапатита, на остеогенезу и карактеристике калуса створеног у дефекту мандибуле пацова (Ignjatović и сар., 2013). Утицај алфакалцидола на процес зарастања фрактура је испитиван само након његове оралне апликације где је показано да има позитивне ефекте на механичке особине и квалитет колагена новонасталог калуса (Saito и сар., 2010). Алфакалцидол представља бољи избор у терапији остеопорозе због својих плејотропних ефеката на метаболизам калцијума, коштаног ткива и мишиће (Shiraishi и сар., 1999; Ringe и Schacht, 2004; Saito и сар., 2010), што је отворило проблем поређења његових ефеката са ефектима обичног витамина Д у комбинацији са истим биоматеријалом као носачем.

У овој докторској дисертацији, ефекти холекалциферола и алфакалцидола на иницијалну (инфламаторну) фазу зарастања, процес ресорпције кости и процес њеног формирања су посебно анализирани у оквиру дискусије.

Инфламаторна фаза представља иницијалну фазу зарастања кости и утицај на њу може умногоме да промени образац регенерације. Резултати дисертације показују да је у иницијалној фази зарастања на површини дефеката СЦ групе пацова, уместо типичне грануломатозне реакције, уочено присуство фиброзног ткива са дебелим колагеним влакнима. Настала фиброза је вероватно последица јаке хроничне инфламаторне реакције ткива на повреду или инсерцију биоматеријала. Фиброзно ткиво настало након имплантације ММК и PRP је распрострањено широко око места дефекта залазећи и у сам дефект. Дебела фиброзна капсула резултује изоловањем оштећеног дела кости са имплантираним биоматеријалом од околног ткива. Она се може уочити и након периода зарастања од осам недеља и овакав резултат указује на

њену перзистенцију, што је сметња за правилну регенерацију кости код пацова из СЦ групе.

Да је настанак фиброзе у СЦ групи последица реакције организма на неку компоненту имплантата говори нам и њено одсуство у групи са спонтаном регенерацијом. Спољашњи калус (кост) који је највероватније резултат активности периоста у СЦ групи пацова је такође много развијенији у односу на екстракортикалну кост у СР групи пацова. Повећана активност периоста такође може бити последица интензивнијег имунског одговора околног ткива на инсерцију страног тела (Kleiman и сар., 1977). Реакција периоста се огледа у пролиферацији ћелија камбијалног слоја, које су на површни формирале нову кост и ћелија фиброзног слоја периоста које су услед повећане синтезе ткивног матрикса довеле до настанка фиброзе. С обзиром на то да је *Bio-Oss* биокompatibilна форма биоматеријала, широко коришћена у ткивном инжењерству, која не доводи до укључивања сложених имунолошких механизма и настанка великих количина фиброзног ткива (Orsini и сар., 2007), вероватно је узрок појачане имунолошке реакције и пратеће фиброзе у СЦ групи управо примењен препарат плазме обogaћене тромбоцитима.

Истраживања су показала да до појачане секреције проинфламаторних цитокина од стране макрофага и пратеће интензивне инфламаторне реакције може доћи и услед апликације препарата плазме обogaћене тромбоцитима (Scull и сар., 2010) која је коришћена у нашем експерименту са циљем да повећа остеоиндуктивност биоматеријала и поспешу регенерацију кости.

Након имплантације биоматеријала, пут од иницијалне инфламаторне фазе до настанка фиброзе зависи од секреције цитокина који су одговорни за настанак фиброзног ткива. Секретовани цитокини од стране активираних макрофага и гигантских ћелија на површини биоматеријала зависе како од својстава самог имплантираног материјала са којим су у контакту, тако и од присуства одређених компоненти које могу да модификују степен хроничне инфламације (Anderson, 2001; Anderson и сар., 2008). За разлику од инертних, нецелуларизованих биоматеријала, који активирају искључиво М2 макрофаге и помажу регенерацију ткива, суплементација материјала чак и аутологним ћелијама доводи до укључивања М1 проинфламаторних макрофага и Th1 имунског одговора који воде ка хроничној инфламацији, фибрози и настанку ожиљка (Brown и сар., 2009; Franz и сар., 2011).

У овој дисертацији, компоненте које су додате биоматеријалу су форме витамина Д у експерименталним групама или препарат PRP који је саставни део имплантата у свим групама, осим контролне CP групе. На основу добијених резултата може се видети да су ове две компоненте имале различит утицај на догађаје у месту дефекта након имплантација.

Можемо претпоставити да је след догађаја у СЦ групи био перманентна секреција проинфламаторних цитокина од стране адхерентних макрофага и мултинуклеарних гигантских ћелија активираних убаченим имплантатом, што је довело до хроничне инфламације, оштећења екстрацелуларног матрикса и настанка дебеле фиброзне капсуле. Интензивна секреција проинфламаторних цитокина је вероватно узрок појачане диференцијације и активације остеокласта којих има доста у дефекту СЦ групе и врше ресорпцију партикула биоматеријала и ремоделацију новонастале кости.

Добијени резултати хистолошке анализе показују да је одсуство фиброзе карактеристика животиња из витамин Д група што би значило да су обе форме витамина Д довеле до супресије хроничног инфламаторног одговора насталог као реакција на присуство и немогућност ресорпције имплантата. У њима се може видети „типична реакција организма на страном тело“ (енг. *Foreign body reaction*) која се карактерише гигантским мултинуклеарним ћелијама и гранулационим ткивом, који су више заступљени у околном меком ткиву него у самом месту дефекта. У месту дефекта животиња из витамин Д група, ближе његовој површини, се може уочити развијена грануломатозна реакција богата крвним судовима. Умерена инфламаторна реакција делује стимулативно на сам процес регенерације због настанка великог броја крвних судова и инфилтрације ћелија неопходних за синтезу нове кости (Mountziaris и Mikos, 2008) и најчешће не води ка настанку фиброзе. С обзиром на веће присуство ћелија и крвних судова у АЦ групи пацова, алфакалцидол је очигледно оставио јачи утицај регрутовање мезенхимских ћелија костне сржи што се може видети и у другим студијама (Beresford и сар., 1994).

Поред гранулационог ткива, код пацова из обе витамин Д групе се може уочити присуство гигантских мултиједарних ћелија, које одсуствују у контролним групама. Настанак гигантских ћелија је уобичајна реакција организма на присуство неимуногених честица у којој оне окружују партикуле биоматеријала у циљу његове

изолације од околног ткива и евентуалне фагоцитозе (Anderson и сар., 2008). Ова реакција на страно тело не укључује сложене имунолошке механизме већ је заснована углавном на фрустрираној фагоцитози страних честица и настанак тзв. „фагоцитних гранулома“ (de Brito и Franco, 1994). Сматра се да су за фузију макрофага и настанак гигантских ћелија одговорни IL-4 и IL-13, цитокини које производе Th2 помоћнички лимфоцити (Као и сар., 1995; McNally и Anderson, 1995; DeFife и сар., 1997) и њихова секреција је позитивно регулисана витамином Д (Boonstra и сар., 2001). Међутим, дугорочна ресорпциона активност мултинуклеарних гигантских ћелија није потврђена без обзира на њихово стално присуство (Anderson, 2001), о чему ће бити речи у даљем тексту.

За разлику од околног меког ткива, партикуле биоматеријала су у месту дефекта животиња из витамин Д група, током раног периода регенерације, биле окружене танким слојем везивно-ткивних ћелија без претеране синтезе екстрацелуларног матрикса, док су неки делови биоматеријала, нарочито у унутрашњости дефекта, опкољени трабекулама нове кости. Одсуство фиброзне капсуле са дебелим колагеним влакнима око партикула биоматеријала такође указује на супресован процес инфламације. На основу добијене слике раног процеса регенерације, може се претпоставити да су обе форме витамина Д модулирале секрецију цитокина и фактора који фаворизују фиброзу.

Витамин Д је широко познат као анти-инфламаторни агенс јер спречава ослобађање проинфламаторних цитокина (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) од стране активираних макрофага и моноцита (Zhang и сар., 2012), док с дуге стране промовише секрецију имуносупресорних цитокина IL-4, IL-10 и TGF- $\beta$  (Cantorna и сар., 1998). Показано је такође да хормоналне форме витамина Д супресују Th1 ћелијски одговор и промовишу развој Th2 одговора (Lemire и сар., 1995; Cantorna и сар., 1998; Jirapongsananuruk и сар., 2000; Deluca и Cantorna, 2001), захваљујући присуству VDR на наивним CD4+ Т ћелијама (Boonstra и сар., 2001). 1,25(OH)D<sub>3</sub> доводи до стварања толерогених APC (Mathieu и Adorini, 2002; Adorini и сар., 2003), што је нашло примену у лечењу аутоимунских болести и спречавању одбацивања калема. Према томе, може се рећи да је витамин Д био одговоран за супресију имунског одговора након имплантације носача захваљујући чему је спречио формирање фиброзног ткива.

Цитокини су кључни фактори у процесима синтезе и ремоделације колагена тако да се модулацијом њихове секреције може спречити настанак фиброзе. Агенси који имају утицаја на секрецију ових цитокина могу да послуже у борби против нежељеног фиброзног ткива током процеса зарастања. Глукокортикоиди успешно смањују деградацију екстрацелуларног матрикса и настанак фиброзе супресујући ослобађање TGF- $\beta$  и инфламаторну реакцију (James и Zumla, 1999). Међутим, употреба глукокортикоида је ограничена. С друге стране, антиинфламаторни нестероидни лекови такође супресују инфламаторни одговор, али не спречавају настанак фиброзе. Према литератури, витамин Д доказано повећава секрецију IL-4 и TGF- $\beta$  (Cantorna и сар., 1998) који, с друге стране, имају улогу у депозицији колагена. TGF- $\beta$  је нарочито познат као профибротички агенс (Epstein и сар., 1994; Clark, 1996). Међутим, истраживања су показала да витамин Д инхибира TGF- $\beta$ –SMAD сигнални пут који је одговоран за настанак фиброзе у ткивима (Flanders и сар., 2004) директном интеракцијом са SMAD-3 и на тај начин спречава фиброзу у јетри и бубрезима (Aschenbrenner и сар., 2001; Ito и сар., 2013; Weilfuss и сар., 2015). Секреција TGF-beta је неопходна у процесу зацељивања ткива, јер овај цитокин има различите функције које укључују и друге сигналне путеве. Дефицијенција витамина Д доводи до смањене експресије TGF- $\beta$  у калварији миша водећи ка дефектном процесу формирања кости (Finkelman и сар., 1991) што указује на то да је витамин Д његов позитивни модулатор.

Из добијених резултата можемо закључити да уочени ефекти локалног утицаја витамина Д на рану фазу зарастања кости могу бити образложење за његову потенцијалну клиничку употребу у циљу решавања честих проблема који се срећу током процеса регенерације, као што су неправилно срастање и псеудоартроза.

Промене до којих је дошло у почетној, инфламаторној, фази регенерације можемо сматрати одговорним за промене у обрасцу даљег зарастања дефеката у експерименталним групама, јер су довеле до измена у хомеостази цитокина који су одговорни за даље процесе изградње и разградње кости.

Познато је да је ресорпција кости директно у вези са обрасцем расположивих цитокина који су њени кључни регулатори (Lorenzo и сар., 2008; Schett, 2011), при чему се проинфламаторни цитокини другачије могу назвати проресорптивни цитокини. Према томе, ефекти витамина Д на имунски систем и секрецију цитокина се у великој мери одражавају и на ресорпцију кости. Пошто је ресорпција кости део процеса

ремоделације, сви агенси који утичу на њу могу битно да промене регенерацију кости. Како би испитали ефекат витамина Д на процес ресорпције, у нашој студији су коришћене ресорбилне партикуле ММК и процењивана је њихова површина у односу на укупну површину дефекта током времена. На овај начин је могуће проценити и да ли комбиновани третман биоматеријала и витамина Д може допринети ојачању места дефекта и у том смислу бити клинички употребљив.

Добијени резултати докторске дисертације показују да холекалциферол и алфакалцидол битно мењају процес ресорпције кости у односу на контролне групе као и да се међусобно разликују у свом анти-ресорптивном потенцијалу.

Овакви закључци произилазе из резултата који показују да је највећа количина преосталих ММК партикула измерена у дефекту АЦ групе, док ХЦ и СЦ група имају знатно нижи проценат материјала у дефекту. Такође, и ХЦ и СЦ група се међусобно разликују са знатно мањом количином ММК измереном у дефекту СЦ групе. Резултати показују да оба витамина поседују антиресорптивне особине као и да су антиресорптивна својства алфакалцидола јача у односу на својства холекалциферола.

Антиресорптивна активност алфакалцидола у остеопоротичним условима је потврђена у многим другим студијама (Shiraishi и сар., 1999; Shiraishi и сар., 2000; Li и сар., 2003). Због различитог механизма активације и деловања, алфакалцидол представља бољи избор у третману остеопорозе у односу на неактивну форму витамина Д (Lau и Baylink, 1999; Shiraishi и сар., 1999; Shiraishi и сар., 2000; Ringe и Schacht, 2004). Takasu и сар. (2006) су показали да синтетички аналози витамина Д имају већи утицај на ресорпцију кости због могућности да директно делују на прекурсоре остеокласта у костној сржи, чиме спречавају њихову диференцијацију у зреле, активне ћелије.

Резултати који указују на супресију процеса ресорпције кости од стране витамина Д, подржани су и мерењем активности ензима киселе фосфатазе који представља маркер коштане ресорпције.

У АЦ групи пацова је две недеље након третмана забележена знатно нижа вредност киселе фосфатазе у поређењу са осталим групама и добијени резултати показују да се ниска вредност одржава током извођења читавог експеримента. Овај резултат показује да је алфакалцидол оставио дугорочне ефекте на процес ресорпције након локалног третмана, односно, да је променио образац ресорпције који је

карактеристичан за контролу носача (СЦ групу). Смањене вредности овог ензима указују на смањену активност остеокласта и редуковану коштану разградњу под утицајем алфакалцидола.

Активност киселе фосфатазе у серуму животиња чији су дефекти третираны имплантатима са холекалциферолом (ХЦ група) се две недеље након имплантација статистички не разликује у односу на групе животиња чији су дефекти третираны имплантатима без витамина Д (контролне групе), али су њене вредности више у односу на контролу носача и скоро идентичне вредностима негативне контроле. Третман холекалциферолом у комбинацији са носачем, након периода зарастања од две недеље, није довео до промена у односу на негативну контролу без обзира на то што је сам носач повећао вредности ALP и снизио вредности AP у СЦ групи у односу на СР групу пацова. Међутим, забележене су разлике у активности AP у оквиру ХЦ групе, између два периода жртвовања. Група пацова, жртвована након осам недеља од имплантације показује знатно ниже вредности киселе фосфатазе у односу на групу жртвовану након две недеље. Из овога можемо видети да се ефекти холекалциферола на вредност AP очигледно испољавају касније и у мањој мери у односу на ефекте алфакалцидола. Закаснили и знатно слабији утицај холекалциферола на смањење активности киселе фосфатазе као параметра ресорпције кости може бити последица: 1. потребе холекалциферола за двоструком хидроксилацијом (Overbergh и сар., 2000; Nuti и сар., 2006); 2. немогућности деловања у пуној дози због негативне регулације након евентуалног уласка путем костне сржи у системску циркулацију (Nuti и сар., 2006; Ringe, 2006); 3. слабијим утицајем на инхибицију синтезе проинфламаторних цитокина што је првенствено особина активних витамин Д аналога као што је алфакалцидол (Mathieu и Adorini, 2002).

Без обзира на велики број присутних гигантских мултинуклеарних ћелија на периферији дефекта АЦ и ХЦ групе пацова у иницијалној фази зарастања, коначан резултат процене ресорпције кости је њена инхибиција. Партикуле биоматеријала у дефекту АЦ групе су слабо ресорбоване након осам недеља од имплантација, иако је након две недеље у овој групи уочено присуство великог броја гигантских мултинуклеарних ћелија које се могу повезати са интензивним процесом ресорпције. Ове супротности указују на сложене механизме деловања активних форми витамина Д на остеокласте и остеобласте, као и на њихов велики утицај на хомеостазу цитокина

који су кључни у процесу ресорпције кости. IL-4 и IL-13 се заправо сматрају одговорним за фузију макрофага у гигантске ћелије (Као и сар., 1995) и они су позитивно регулисани од стране витамина Д (Boonstra и сар., 2001) чиме би се и објаснило њихово повећано присуство у експерименталним групама. Потврђено је да IL-4 повећава формирање TRAP негативних (енг. *tartrate-resistant acid phosphatase*, TRAP) мултинуклеарних ћелија, док смањује број TRAP позитивних, тако што стимулише формирање макрофагних поликариона, док инхибира регрутовање прекурсора остеокласта из костне сржи од којих би настали активни мултинуклеарни остеокласти (Kasano и сар., 1993). Из ових разлога, настанак мултинуклеарних ћелија под утицајем витамина Д не мора нужно да води у активан процес ресорпције за који су одговорни проинфламаторни (проресорптивни) цитокини, IL-1 и TNF- $\alpha$ , који су негативно регулисани витамином Д, а нарочито његовим активним формама (Zupan и сар., 2013). Сама величина гигантских ћелија такође може да указује на слабу могућност ресорпције у групама са витамином Д, због чега је дошло до интензивног фузионисања макрофага са циљем да лакше ресорбују унети материјал. Мултинуклеарне ћелије нађене код животиња из СЦ групе су знатно мањих димензија у односу на гигантске мултинуклеарне ћелије у витамин Д групама што нас доводи до претпоставке да је ресорпција у СЦ групи очигледно подржана од стране проресорптивних цитокина и Th1 лимфоцита за разлику од експерименталних група у којима је витамин Д супримирао ресорпцију, вероватно смањујући секрецију ових цитокина. Овим се може објаснити и нешто интензивнији процес ресорпције у ХЦ групи услед слабијег утицаја холекалциферола на супресију проресорптивних цитокина. Гигантске ћелије нађене у дефекту код животиња из ХЦ групе су и малобројније у односу на оне из АЦ групе уз истовремено мањи број нересорбованих партикула ММК што такође указује на интензивнији процес ресорпције у ХЦ групи, сличнији оном забележеном у контроли носача.

Код пацова из АЦ групе, дуж дефекта је уочена другачија дистрибуција мултинуклеарних ћелија при чему су гигантске ћелије претежно детектоване у грануломатозној реакцији на површини дефекта, док се у области дефекта који је ближи костној сржи, не може уочити њихово присуство. Могуће је да су зрели макрофаги који су регрутовани на периферији дефекта након апликације витамина Д били под великим утицајем IL-4 и IL-13 који фаворизују њихову фузију у



мултинуклеарне гигантске ћелије (Као и сар., 1995), док је везивање витамина Д за VDR на прекурсорима остеокласта из костне сржи спречило њихову диференцијацију у зреле ћелије (Takasu и сар., 2006). Roodman и сар. (1985) су показали да концентрација било ког витамин Д аналога  $>100$  nM инхибира формирање мултинуклеарних ћелија из њихових прекурсора, чиме се може оправдати слабо присуство мултинуклеара у унутрашњости дефекта коришћењем високих концентрација овог витамина. Такође, IL-4, који је одговоран за настанак макрофагних поликариона, инхибиторно делује на формирање остеокласта из њихових прекурсора у костној сржи (Kasano и сар., 1993). Према томе, догађаји у дефекту до којих долази под утицајем алфакалцидола могу бити специфични за место и/или да зависе од степена диференцијације ћелија кости. Свакако треба узети у обзир и сам дизајн експеримента где је витамин Д даван прва три постимплантациона дана у место дефекта, при чему би ћелије на површини дефекта могле да буду под његовим јачим утицајем.

Механизам деловања витамина Д на ресорпцију кости још увек није у потпуности разјашњен и тумачи се на различите начине. За разлику од *in vitro* истраживања која су указала на проресорптивну функцију витамина Д преко повећане експресије RANKL на стромалним ћелијама (Yasuda и сар., 1998), *in vivo* истраживања су показала да апликација витамин Д аналога доводи и до инхибиције RANKL индуковане ресорпције у условима са повећаном активношћу остеокласта карактеристичним за остеопорозу (Takasu и сар., 2006). Директним деловањем преко VDR рецептора на прекурсорима остеокласта показано је да активне форме витамина Д спречавају RANKL индуковану терминалну диференцијацију макрофагно-моноцитне хематопоетске линије у зреле остеокласте преко супресије *c-fos* протеина који се налази у RANKL-RANK сигналном путу (Takasu и сар., 2006). Дакле, хематопоетске ћелије које су RANK позитивне и одговарају на RANKL стимулусе стварањем остеокласта су такође и циљне ћелије деловања витамина Д преко VDR рецептора при чему ће од баланса сигнала које оне примају зависити модулација процеса ресорпције кости. Код оваријектомисаних модела пацова и мишева, аналози витамина Д супресују остеокластогенезу коришћењем нижих, али и изузетно високих доза, чиме смањују број прекурсора остеокласта у костној сржи (Shibata и сар., 2002) и доводе до смањене ресорпције и очувања коштане густине. У студији Takahashi и сар. (2014) забележена је смањена експресија RANKL у костима под деловањем витамин Д аналога која је

објашњена смањеним бројем RANKL позитивних остеобласта који вероватно припадају незрелим ћелијама остеобласне ћелијске линије. Коначан ефекат, који подразумева супресију ресорпције кости, настаје услед утицаја витамина Д на диференцирање незрелих у зреле ћелије са смањеном експресијом RANKL молекула као кључог фактора остеоκластогенезе.

Неопходно је поменути и то да ефекти витамина Д у многоме зависе и од коришћене дозе као и од дужине трајања третмана. Раније студије су показале да се ефекти акутног и хроничног третмана разликују након системске администрације активних форми витамина Д као и да је потребно више од једног третмана високим дозама (најчешће три) како би се започета ресорпција кости преокренула у супресију иницијалне ресорптивне фазе (Воусе и сар., 1985; Erben и сар., 1997). *In vitro* студије су показале да су инхибиторни ефекти активних форми витамина Д на остеоκластогенезу забележени при нижим, а нарочито применом високих концентрација,  $> 10^{-9}$  М (Erben, 2001; Takahashi и сар., 2014) које су коришћене у овој дисертацији.

Из наведеног можемо закључити да антиресорптивне особине алфакалцидола чине овај витамин бољим третманом у лечењу остеопорозе због особине да готово зауставља ресорпцију кости на месту апликације. Међутим, уколико је циљ третмана постићи бољу регенерацију користећи разградиве заменике кости, третман алфакалцидолом не представља добро решење због велике количине нересорбованих партикула биоматеријала које онемогућавају формирање нове кости. Можемо претпоставити да би коришћење лакше ресорбилних партикула (нпр. нанопартикула) као носача могло да да боље резултате у овом циљу због њихове брже ресорпције у условима редуковане активности остеоκласта узроковане алфакалцидолом. Такође би и истовремена употреба нересорбилних биоматеријала (нпр. титанијумских имплантата) и алфакалцидола могла да представља адекватну комбинацију с обзиром да би дошло до очувања интегритета материјала због јаке имуносупресорне активности ове форме витамина. Третман холекалциферолом показује мању анти-ресорптивну активност и повољнију комбинацију са примењеним носачем у погледу регенерације кости.

Лекови који се користе у превенцији остеопорозе најчешће имају анти-катаболичке ефекте. За алфакалцидол је показано да поред ефекта на супресију процеса ресорпције кости може да има и позитиван ефекат на њену изградњу (Shiraishi и сар., 2000). Према добијеним резултатима дисертације, обе форме витамина Д су

показале ефекте на регенерацију кости с тим што се њихови ефекти на процес формирања кости и карактеристике новонасталог калуса, разликују.

Хистолошке слике раног периода зарастања показују да је дошло до извесног кашњења у формирању калуса у дефектима код животиња из АЦ и ХЦ групе. Овај период се у витамин Д групама карактерише присуством велике количине ММК партикула, малом количином новоформиране кости и обиљем ћелија за које се може претпоставити да су пореклом из костне сржи. За разлику од витамин Д група, контролне групе пацова показују већу количину нове кости у дефекту након периода регенерације од две недеље.

На основу мало нове кости у АЦ групи после две недеље зарастања и завршене рестаурације дефекта ове групе након осам недеља зарастања, долазимо до закључка да алфакалцидол одлаже рану фазу формирања калуса. Исти, али мање изражени ефекти су добијени и применом холекалциферола, што се може видети на основу нешто веће количине новоформиране кости у дефекту. Одложено формирање калуса је уочено и коришћењем других лекова у третману остеопоротичних фрактура међу којима су бифосфонати и нестероидни анти-инфламаторни лекови (Butcher и Marsh, 1996). Кашњење регенерације након примене стероида и нестероидних анти-инфламаторних лекова може да указује да је управо утицај на инфламаторну фазу и хомеостазу цитокина оставио велики печат у даљем процесу зарастања дефеката и представља кључ одложене регенерације кости.

Познато је да су проинфламаторни цитокини колико штетни толико и корисни у процесу регенерације (Mountziaris и Mikos, 2008), тако да је њихова умерена секреција неопходна за успешан процес зарастања кости. Одложено формирање калуса је вероватно последица инхибиције секреције проинфламаторних цитокина од стране витамина Д што се показало корисним у избегавању фиброзе али је довело и до закаснеле регенерације. Ово се пре свега може односити на ефекат витамина Д на секрецију проинфламаторног IL-6 за кога се зна да је један од кључних цитокина у раном процесу регенерације фрактура (Yang и сар., 2007). Већ је показано да дефицијенција витамина Д доводи до повећане експресије IL-6 (Laird и сар., 2014), док третман витамином Д смањује експресију и функцију IL-6 (Müller и сар., 1991; Hopkins и сар., 2011). Недостатак IL-6 одлаже рани стадијум зарастања фрактура укључујући и сазревање и минерализацију калуса и доприноси формирању слабо-минерализованог

калуса са повећаним садржајем хрскавице (Yang и сар., 2007). Пошто је оваква слика раног процеса зарастања дефеката забележена у групама са витамином Д, вероватно је узрок одложене регенерације дефеката у нашем експерименту био утицај витамина Д, нарочито алфакалцидола, на експресију IL-6.

Резултати дисертације су показали да не постоје значајне промене у вредностима алкалне фосфатазе, калцијума и фосфора, између група у оквиру истог као ни између два различита термина зарастања. Међутим, ипак је примећен пораст активности алкалне фосфатазе након две недеље регенерације у АЦ и СЦ групи у поређењу са СР и ХЦ групом. Узимајући у обзир да је алкална фосфатаза ензим који у великој мери настаје у остеобластима, као и да њене високе вредности указују на интензиван процес зарастања насталих фрактура (Kompenou и сар., 2005; Nakagawa и сар., 2006), пораст активности у серуму животиња ове две групе се може разматрати као последица примењених третмана и интензивне регенерације у другој недељи зарастања. Две недеље након имплантација, у АЦ и СЦ групи је забележена највећа густина ћелија у месту дефекта што може да оправда појачану синтезу овог ензима од стране бројних остеобласта. Узимајући у обзир и мало новоформиране кости у дефекту АЦ групе, може се претпоставити и да под утицајем алфакалцидола остеогенеза у другој недељи тек почиње, док је у СЦ групи стимулирана раније имплантатима од ММК и PRP. Услед овако забележене слике, мала количина формираног калуса у дефекту АЦ групе је вероватно последица ефеката алфакалцидола на хомеостазу цитокина више него инхибиторног ефекта на саме ћелије. Подаци из литературе показују да системски апликован алфакалцидол, поред тога што спречава ресорпцију кости, остварује своје ефекте и на њено формирање (Shiraishi и сар., 2000; Takahashi и сар., 2014), док холекалциферол није показао директан утицај на формирање кости, вероватно због немогућности да делује у високим дозама због негативне регулације његове синтезе (Ringe и Schacht, 2004).

Хистолошким праћењем процеса регенерације уочене су битне разлике у начину формирања калуса између група у којима је зарастање потпомогнуто различитим имплантатима. У дефекту СЦ групе, две недеље након имплантације, може се видети да је дошло до репопулације и замене партикула ММК чиме оне представљају активне учеснике у процесу регенерације. Такође, нова кост се у дефекту ове групе претежно формирала уз партикуле биоматеријала. С обзиром на резултате

добијене у ранијим студијама где су партикуле *Bio-Oss*-а у процесу регенерације дефеката показале врло слабу репопулацију и замену, изгледа да је PRP допринела повећаној остеоиндуктивности и остеоиндуктивности овог биоматеријала као и његовој бржој замени новом кости. Овоме у прилог иду и резултати морфометријских анализа који показују најмању количину партикула ММК у СЦ групи током читавог периода праћења регенерације. Суплементација ММК плазмом обогаћеном тромбоцитима је у ранијим истраживањима довела до повећаног формирања кости и брже деградације биоматеријала (Shayesteh и сар., 2005), што је у складу са нашим резултатима.

Насупрот томе, присуство алфакалцидола је знатно успорило ресорпцију партикула и њихово насељавање, што се може видети на основу њихове велике количине у дефекту током читавог периода регенерације. Из овога се може претпоставити да се регенерација кости у АЦ групи, за разлику од СЦ групе, одвија углавном без учешћа партикула биоматеријала тако да оне леже у дефекту попут „острвца“ и ометају формирање нове кости. Слабије учешће партикула ММК у односу на СЦ групу је забележено и у регенерацији дефеката код животиња из ХЦ групе, али се на појединим местима у дефекту ипак може уочити синтеза нове кости у оквиру партикула што указује на њихову постепену замену. Изгледа да су ове разлике у начину формирања калуса последица већ поменутих имуносупресорних ефеката карактеристичних за хормоналне форме витамина Д (Alroy и сар., 1995; Takeuchi и сар., 1998) које се иначе користе у циљу превенције одбацивања калема (Mathieu и Adorini, 2002; Amuchastegui и сар., 2005).

Костна срж представља врло битну компоненту у процесу зарастања дефеката. Она је важан извор прекурсора остеогених ћелија које су неопходне у процесу регенерације. С друге стране, прогенитори остеобласта из камбијалног слоја периоста такође доприносе регенерацији преломљене кости (Shimizu и сар., 2001). Резултати хистолошке и СЕМ анализе дефеката након две недеље зарастања, показују да је приликом третмана алфакалцидолом најпре забележено формирање коштаних трабекула у делу дефекта уз костну срж као и у самом њеном лумену. На периферији дефеката АЦ групе се може уочити слаба синтеза спољашњег калуса што може да указује на слабу али и одложену активност периоста у раној регенерацији. Оваква слика дефеката код животиња из АЦ групе може се објаснити различитим утицајем

активне форме витамина Д на прекурсоре остеобласне ћелијске линије пореклом из периоста и костне сржи при чему се ко-третман алфакалцидола са ћелијама костне сржи може сматрати добром комбинацијом због повећаног формирања кости уз централну шупљину. За периостално формирање калуса неопходно је присуство и активност инфламаторних макрофага, док и инфламаторни и резидентни макрофаги могу да промовишу анаболичке механизме током ендохондралног формирања кости (Raggatt и сар., 2014). Пошто је алфакалцидол јак анти-инфламаторни агенс, закаснела периостеална реакција се може објаснити његовим утицајем на процес инфламације, о коме је већ било речи. Не треба искључити и чињеницу да су ћелије на површини вероватно биле изложеније коришћеном тродневном третману, који је на њих могао да остави јачи супресорни ефекат.

Након периода регенерације од осам недеља се на неким пресецима у оквиру АЦ групе може уочити присуство спољашњег калуса који доприноси регенерацији дефеката што указује на његову накнадну реакцију након почетне супресије. За разлику од АЦ групе, периост је у великој мери допринео формирању нове, екстракортикалне кости у СР, СЦ, па чак и ХЦ групи у раној фази регенерације. У овим групама дошло је до површинског ојачања кости формирањем спољашњег, периостеалног калуса, док је алфакалцидол обезбедио потпору са унутрашње стране дефекта, доводећи до интрамедуларног формирања кости у региону костне сржи, уз окупирање и дела сржи пре и после преломљеног места.

На основу постојеће литературе која се односи на лечење остеопоротичне кости, може се доћи до закључка да не постоји третман који истовремено доприноси побољшању свих параметара кости. За разлику од тога, уочен је компензаторни механизам којим различити третмани фаворизују одређене параметре на рачун других. Уколико је циљ интервенције да се брзо премости дисконтинуитет у нивоу прелома, без обзира на квалитет новостворене кости, холекалциферол и алфакалцидол не представљају добар избор терапије за његово лечење, због кашњења у раној фази зарастања кости. Међутим, проблеми са зарастањем остеопоротичних прелома се огледају и у лошој примарној фиксацији прелома, лошој осеоинтеграцији и слабом квалитету калуса који може бити место поновног прелома (Dai и Нao, 2007).

Резултати ове докторске дисертације који проистичу из анализе квалитета новоформиране кости показују да холекалциферол и алфакалцидол утичу на квалитет

калуса насталог у дефекту фемура под остеопоротичним условима и то на међусобно различит начин.

Анализом органског дела кости уочено је да је стварње нове кости богате колагеном изражена карактеристика АЦ групе која се може видети са слика препарата бојених трихромним бојењем по *Masson*-у. Нова кост се у АЦ групи након оба периода растања врло интензивно боји на колаген који је густо упакован у новонастали калус. Хистолошке слике и SEM микрографије кости, након периода регенерације од осам недеља, показују и организацију колагених влакана у паралелне снопове. Са препарата бојених HE, TM и TB се у калусу АЦ групе може видети и највећи број остеоона који представљају карактеристику компактне кости. Дакле, нова кост код животиња из АЦ групе показује изражену ламеларну структуру карактеристичну за зрелу, компактну кост за разлику од осталих група где је према TM бојењу кост хистолошки зрелија али не тако добро организована. Раније студије које су се бавиле утицајем алфакалцидола на структуру остеопоротичне кости, показале су његов допринос квалитету и структури колагена док се обичном витамину Д није могла преписати оваква особина (Nagaoka и сар., 2008).

У дефектима животиња који су третирани имплантатима са холекалциферолом (ХЦ група) се не може уочити нека посебна разлика у колагеној депозицији у калусу у односу на дефекте који су спонтано зарастали (СР група). За разлику од њих, у СЦ групи постоје делови калуса који се могу окарактерисати као „незрела кост богата колагеном“ и могу се повезати са местима репулације и замене ММК партикула као и местима ремоделације. Испод великог броја оваквих одељака се назире ММК партикуле које се постепено ресорбују. Настанак густе, колагеном богате целуларизоване кости на местима партикула ММК у СЦ групи може да указује на појачану остеокондуктивност *Bio-Oss*-а коме је додата PRP. Места партикула ММК које се замењују су окружена ламеларном кости која је формирана услед њиховог остеоиндуктивног утицаја. Околна кост, која није створена уз биоматеријал, је сиромашнија колагеном и богата је широким лакунама карактеристичним за остеопорозу, вероватно због њеног смањеног биолошког капацитета.

Поред колагена који је главна органска компонента кости, остеокалцин и остеокалцин представљају неколагене протеине коштаног матрикса који се у великој мери експримирају током раног процеса регенерације. Што се тиче имуноекспресије

остеопонтина у дефекту, може се рећи да су обе форме витамина Д допринеле његовој интензивнијој секрецији у месту дефекта, након периода регенерације од две недеље. На основу доступне литературе, потврђено је да витамин Д позитивно утиче на експресију гена и секрецију овог раног маркера остеогенезе (Bellows и сар., 1999).

Током процеса формирања, ремоделације и репарације кости, остопонтин има улогу у регулацији процеса калцификације матрикса, што је нарочито важно код патолошки минерализованих ткива (McKee и Nanci, 1996). Такође, његова улога као адхезивног протеина омогућава везивање остеокласта за коштани матрикс који ће бити ресорбован њиховом активношћу што је у вези са његовом експресијом на местима ремоделације кости. Као адхезивни протеин, он учествује у везивању ћелија и матрикса, апозицији минерала на органски матрикс и повезивању минерализованих и неминерализованих делова кости чиме доприноси интегритету калуса (McKee и Nanci, 1996). Поред интензивне експресије остеопонтина у ћелијама везивног ткива витамин Д група које окружују трабекуле новостворене кости, и саме трабекуле ХЦ групе и СЦ групе показују велику позитивност ћелија на остеопонтин. Јака експресија остеопонтина у ћелијама око трабекула формираних у дефекту витамин Д група указује на активност остеобласта у синтези коштаног матрикса. Групе без витамина Д нису показале овако висок ниво експресије у околном везивном ткиву што се може повезати са одсуством терапије и одмаклом регенерацијом. Трабекуле АЦ групе се састоје из мањег броја ћелија позитивних на остеопонтин што може да укаже на слабу минерализацију и присуство незрелог калуса што је потврђено и ТМ бојењем. Насупрот калусу ХЦ групе који показује периферну минерализацију, калус АЦ групе је према ТМ бојењу претежно изграђен из остеоида са slabим знацима минерализације.

Осам недеља након имплантација, експресија је слаба и ограничена у свим групама на местима ремоделације и ресорпције биоматеријала, укључујући активне остеоците којих има у великом броју у СЦ групи. Повећана експресија око, на месту, и у близини партикула ММК у групама третираним витамином Д може да укаже на активан процес њихове ресорпције и замене новом кости услед попуштања анти-ресорптивног ефекта витамина.

Остеокалцин је неколагени протеин матрикса кога синтетишу претежно зрели остеоцити и касније остеоцити, али у мањој мери. С обзиром на чињеницу да је остеокалцин познат као протеин који је одговоран за уградњу калцијума у кости,



његова експресија се повезује са минерализацијом која представља пратећи процес у сазревању кости. Резултати ове дисертације јасно показују разлику у секрецији овог протеина матрикса између контролних и експерименталних група. Остеокалцин је појачано експримиран на местима синтезе кости, у везивном ткиву око трабекула група третираним витамином Д, док се у СЦ групи и СР групи уочава његова слабија експресија у овим ћелијама. У поређењу са СР групом, нешто већи ниво експресије у ћелијама које належу на трабекуле СЦ групе се може објаснити остеоиндуктивношћу партикула ММК и PRP док се, са друге стране, већи број позитивних ћелија у калусу СР групе може објаснити интензивном калцификацијом хрскавице, на чије присуство указује и ТВ бојење. На основу позитивности у месту дефекта, добијени резултати показују да холекалциферол и алфакалцидол повећавају експресију остеокалцина у ћелијама око трабекула у односу на ниво присутан у контролним групама. У литератури се могу наћи подаци да 1,25(OH)D<sub>3</sub> промовише експресију и секрецију остеокалцина директним утицајем на експресију гена за наведени протеин (Bellows и сар., 1999).

Поређењем дефеката АЦ и ХЦ групе, може се уочити разлика у месту експресије остеокалцина. У АЦ групи, остеокалцин је претежно експримиран у околном матриксу и то од стране остеобласта чија је функција изградња новог коштаног ткива. ХЦ група, поред позитивне имуноекспресије у остеобластима показује и интензивну експресију остеокалцина у новоформираним трабекулама, од стране ћелија заробљених у лакунама које се могу поистоветити са остеоцитима. Ове ћелије у АЦ групи показују врло слабу или негативну експресију остеокалцина. Имајући у виду да је секретован остеокалцин неопходан за везивање калцијума током формирања кости као и током процеса сазревања и ремоделације, оваква дистрибуција експресије остеокалцина у почетној фази зарастања може довести до закључка да је калус настао под утицајем алфакалцидола млађи и слабије минерализован од калуса насталог под утицајем холекалциферола. Овоме у прилог иду и резултати ТМ бојења који показују да је минерализација калуса ХЦ групе након две недеље, увелико присутна. Калус АЦ групе је изграђен из младог коштаног ткива које је изузетно богато колагеном са видљивим знацима периферне минерализације.

Након периода регенерације од осам недеља, АЦ и ХЦ група показују експресију остеокалцина углавном у трабекуларној кости која је окружена костном

сржи и, у случају АЦ групе, партикулама ММК. Ово може да укаже на минерализацију насталих трабекула у унутрашњем делу калуса, док ћелије у делу калуса ближе периферији не показују експресију остеокалцина. Према резултатима ТМ бојења који показују да је калус у ХЦ групи већ добро минерализован, одсуство експресије остеокалцина у ћелијама на периферији је очекивана. Међутим, негативне ћелије у калусу АЦ групе, који је претежно изграђен из неминерализованог матрикса, могу да указују на оштећену минерализацију која настаје под утицајем примењене дозе алфакалцидола.

*Erben* и сар. (2001) су показали да активне форме витамина Д могу да оштете процес минерализације с тим што је овај њихов ефекат забележен углавном након хроничних третмана високим дозама. С обзиром да је регенерација кости праћена само током периода од осам недеља, не може се са сигурношћу тврдити да ли је процес минерализације у АЦ групи заиста изостао или је само одложен. Међутим, постоје истраживања која указују на то да смањена секреција IL-6, под утицајем активне форме витамина Д, поред тога што одлаже рану остеогенезу, одлаже и процес минерализације кости (*Yang* и сар., 2007).

Микроархитектура остеопоротичне кости у остеопорози је значајно нарушена и узрок је њене смањене механичке чврстине (*Dion* и *Ste-Marie*, 2012). Остеопоротична кост је тања са израженом кортикалном порозношћу и разређеном трабекуларом мрежом што доводи до повећане фрагилности и повећаног ризика за настанак спонтаних фрактура (*Kalpakcioglu* и сар., 2008; *Dion* и *Ste-Marie*, 2012). Хистолошком анализом новоформиране кости у различитим групама се може видети да се кост настала под утицајем алфакалцидола битно издваја у погледу микроархитектуре и микроструктуре у односу на све остале групе. Нова кост у АЦ групи показује велику целуларизованост присутну од самог почетка, без широких лакуна, са мноштвом остеоона и обиљем крвних судова. Бројни остеоци омогућавају интензивнију ремоделацију која доводи до настанка компактног калуса што се може видети са препарата ТМ и ТВ бојења, након периода регенерације од осам недеља.

Ремоделација здраве кости представља координисану активност остеокласта и остеобласта у ресорпционим лакунама и доприноси очувању интегритета скелета. Током постменопаузне остеопорозе, број ремоделационих јединица се повећава док се истовремено смањује капацитет остеобласта да надокнаде ресорбовану кост у њима

услед чега долази до губитка коштаног ткива (Lerner, 2006). У калусу АЦ групе се могу уочити потпуно рестауриране ремоделационе јединице које указују на регулисан баланс између остеобласта и остеокласта у корист изградње кости што увелико смањује порозност калуса, доприноси његовој компактности и формирању хистолошки нормалне кости, без обзира на присуство остеопоротичних услова. Утицај активне форме витамина Д, калцитриола, на позитиван ремоделациони баланс су у свом раду описали и *Erben* и сар. (Erben и сар., 2002).

На основу видљивости граничних линија дефекта и ремоделационих јединица може се закључити да је у АЦ групи добра интеграција присутна како између калуса и старе кости тако и у оквиру калуса, између рестаурираних ремоделационих јединица и околне новоформиране кости. Ове карактеристике указују на изузетну компактност и интеграцију калуса насталог под утицајем алфакалцидола, што се не може рећи и за остале групе.

Нова кост настала у дефекту ХЦ групе и контролних група не показује компактност и интеграцију као што је случај са АЦ групом. Иако је мање присутних ремоделационих јединица и активних остеона у СР и ХЦ групи, остеобласти нису у могућности да надоместе делове недостајуће кости што резултује бројним шупљинама које су карактеристичне за остеопоротичну кост. У СР групи су у остеоцима забележени остеокласти без видљивих знакова синтезе кости на шта указују пресеци са ТВ бојењем. У СЦ групи је ремоделација интензивна али су ремоделационе јединице окружене бројним шупљинама са везивним ткивом које повећавају порозност калуса. Ремоделација је присутна претежно на местима замене партикула биоматеријала тако да је калус доста узак и неправилног облика. ХЦ група не показује видљиву ремоделацију кости и калус се одликује великом порозношћу. Холекалциферол, на супрот алфакалцидолу, доводи до успостављања микроархитектуре кости сличне оној у контролним групама која се карактерише слабом целуларизованошћу, порозношћу и слабом интеграцијом.

Из добијених резултата се може извући закључак да алфакалцидол позитивно регулише процес ремоделације и утиче на процесе интеграције у калусу што заједно доводи до стварања компакне кости. Истраживања која су се бавила утицајем различитих форми витамина Д на процес зарастања фрактура су показала њихов

допринос у побољшању чврстине, интегритета, ремоделације и рестаурације микроархитектуре кости (Fu и сар., 2009).

Имајући у виду да чврстина калуса зависи пре свега од добре микроархитектуре као и да је добра интеграција услов за успешно регенерисану кост која неће бити подложна даљим преломима на истом месту, може се рећи да је алфакалцидол у нашем експерименту више допринео остварењу циља који се односи на ојачање места дефекта. Добро минерализована кост настала под утицајем холекалциферола не доприноси чврстине преломљеног места без адекватне интеграције. Такође, слаба компактност калуса може бити узрок његове фрактуре.

Резултати дисертације указују на широку применљивост обе форме витамина Д при чему избор одговарајуће форме зависи од унапред постављеног циља. Уколико постоји потреба за већом количином добро минерализованог коштаног ткива, холекалциферол ће бити адекватнији третман који ће дозволити и коришћење слаборазградивих микропартикула биоматеријала, као што је *Bio-Oss*, уз њихову постепену замену. Међутим, уколико је циљ третмана добијање кости на месту дефекта која се одликује добром интеграцијом и компактношћу, алфакалцидол представља одлично решење али уз адекватну употребу носача. Избор носача у овом случају је очигледно врло битан и захтева детаљнија истраживања.

## **6. ЗАКЉУЧЦИ**

### **Закључци студије успостављања остеопоротичног модела**

Овариектомија пацова *Wistar* соја доводи до:

- значајног смањења концентрације естрадиола у серуму након периода од три месеца
- повећања активности киселе фосфатазе у првом и алкалне фосфатазе у другом месецу
- снижавања концентрације фосфора у другом и концентрације калцијума у четвртом месецу
- значајног смањења густине кости у дисталном делу фемура након периода од три месеца

Три месеца након овариектомије добијен је модел остеопорозе на пацовима *Wistar* соја.

### **Закључци студије регенерације дефеката остеопоротичне кости под утицајем холекалциферола и алфакалцидола локално примењених као саставних делова имплантата**

**У раној фази регенерације кости :**

- холекалциферол и алфакалцидол одлажу остеогенезу у дефектима направљеним у дисталном делу фемура
- обе испитиване форме витамина Д стимулишу настанак мултиједарних гиганских ћелија које су бројније у групи која је третирана алфакалцидолом
- третман испитиваним формама витамина Д спречава настанак фиброзе која је карактеристична за контролну групу животиња чији су дефекти третирани имплантатима од минералног матрикса кости и плазме обогаћене тромбоцитима
- алфакалцидол доводи до настанка мале количине новоформираног калуса у дефекту, док холекалциферол доводи до настанка солидне количине калуса која је мања у односу на количину калуса који је настао у контролним групама
- спољашњи калус под утицајем третмана алфакалцидолом је редукован за разлику од обиља калуса који настаје у области костне сржи
- калус у групи третираној алфакалцидолом настаје углавном без учешћа партикула имплантираног биоматеријала, док калус у групи третираној

холекалциферолом углавном настаје око партикула биоматеријала као и на рачун њихове успорене ресорпције и замене

#### **У касној фази регенерације кости:**

- обе испитиване форме витамина Д смањују ресорпцију партикула минералног матрикса кости у дефекту у односу на контролну групу, при чему алфакалцидол показује јача анти-ресорптивна својства у односу на холекалциферол
- алфакалцидол доводи до настанка мале количине новоформиране кости око великог броја нересорбованих партикула биоматеријала, док холекалциферол доводи до настака велике количине новоформиране кости око малог броја нересорбованих партикула биоматеријала
- алфакалцидол доводи до настанка нове кости која је богата колагеном и карактерише се слабом или одложеном минерализацијом, док холекалциферол доводи до настанка нове кости која се карактерише одличном минерализацијом
- третман алфакалцидолом стимулише балансирану ремоделацију и формирање компактне кости која се карактерише добром интеграцијом у околну остеопоротичну кост

#### **Општи закључци о потенцијалној примени резултата студије**

Холекалциферол и алфакалцидол су показали бројне ефекте у коришћеном експерименталном дизајну на основу којих се може сугерисати њихова примена као потенцијалних агенаса у решавању различитих проблема у регенерацији остеопоротичне кости. Потенцијална примена обе форме витамина Д је у спречавању фиброзе током процеса регенерације кости, холекалциферола, као стимулаторног агенса за формирање минерализоване кости и алфакалцидола, као агенса за побољшање интеграције новоформиране кости у околну остеопоротичну кост.

Избор одговарајуће форме витамина Д, као и биоматеријала који би био коришћен као имплантат за попуњавање дефеката у кости, треба бити направљен у складу са циљем третмана. Добијени ефекти се могу сматрати валидним само уз ограничење коришћених доза и у примењеном дизајну.

## **7. ЛИТЕРАТУРА**



Adams JS, Sharma OP, Gacad MA, Singer FR. (1983) Metabolism of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> by cultured pulmonary alveolar macrophages in sarcoidosis. *Journal of Clinical Investigation* 72(5): 1856-1860.

Adorini L, Penna G, Giarratana N, Uskokovic M. (2003) Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases. *Journal of cellular biochemistry* 88(2): 227-233.

Aerssens J, Van Audekercke R, Talalaj M, Geusens P, Bramm E, Dequeker J. (1996) Effect of 1 $\alpha$ -vitamin D<sub>3</sub> and estrogen therapy on cortical bone mechanical properties in the ovariectomized rat model. *Endocrinology* 137(4): 1358-1364.

Al-Sherbini MM, Al-Zahrani MS, Alrefaie ZA, Amin HA, Zawawi KH. (2014) Estrogen deficiency reduces the expression of estrogen receptor-beta in Wistar rats' periodontal tissues. *Saudi medical journal* 35(3): 242-247.

Alghamdi HS, van den Beucken JJ, Jansen JA. (2014) Osteoporosis–fracture healing and osseointegration. *Drug Discovery Today: Disease Models*. doi:10.1016/j.ddmod.2014.10.001.

Alkhiary YM, Gerstenfeld LC, Krall E, Westmore M, Sato M, Mitlak BH, Einhorn TA. (2005) Enhancement of experimental fracture-healing by systemic administration of recombinant human parathyroid hormone (PTH 1-34). *The Journal of Bone & Joint Surgery* 87(4): 731-741.

Almerighi C, Sinistro A, Cavazza A, Ciaprini C, Rocchi G, Bergamini A. (2009) 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits CD40L-induced pro-inflammatory and immunomodulatory activity in human monocytes. *Cytokine* 45(3): 190-197.

Alroy I, Towers TL, Freedman LP. (1995) Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D<sub>3</sub>: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Molecular and Cellular Biology* 15(10): 5789-5799.

Amanat N, Brown R, Bilston LE, Little DG. (2005) A single systemic dose of pamidronate improves bone mineral content and accelerates restoration of strength in a rat model of fracture repair. *Journal of orthopaedic research* 23(5): 1029-1034.

Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. (2012) Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering* 40(5): 363-408.

Amuchastegui S, Daniel KC, Adorini L. (2005) Inhibition of acute and chronic allograft rejection in mouse models by BXL-628, a nonhypercalcemic vitamin D receptor agonist. *transplantation* 80(1): 81-87.

Anderson JM. (2001) Biological responses to materials. *Annual Review of Materials Research* 31(1): 81-110.

Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. (2008) Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in immunology* 20(2): 86-100.

Andrade C, Nogueira L, Salata C, da Silva C, Ferreira-Machado S, de Almeida C, Almeida A, Colaço M, Alessio R, Braz D. (2013) Analysis of femur head microstructure in ovariectomized rats. *Journal of Instrumentation* 8(07): C07007.

Andreassen TT, Ejersted C, Oxlund H. (1999) Intermittent parathyroid hormone (1–34) treatment increases callus formation and mechanical strength of healing rat fractures. *Journal of Bone and Mineral Research* 14(6): 960-968.

Andreassen TT, Fledelius C, Ejersted C, Oxlund H. (2001) Increases in callus formation and mechanical strength of healing fractures in old rats treated with parathyroid hormone. *Acta Orthopaedica* 72(3): 304-307.

Aranow C. (2011) Vitamin D and the immune system. *Journal of investigative medicine: the official publication of the American Federation for Clinical Research* 59(6): 881-886.

Aschenbrenner J, Sollinger H, Becker B, Hullett D. (2001) 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> alters the transforming growth factor  $\beta$  signaling pathway in renal tissue. *Journal of Surgical Research* 100(2): 171-175.

Aspenberg P. (2013) Annotation: parathyroid hormone and fracture healing. *Acta Orthopaedica* 84(1): 4-6.

Baldock PA, Thomas GP, Hodge JM, Baker SU, Dressel U, O'Loughlin PD, Nicholson GC, Briffa KH, Eisman JA, Gardiner EM. (2006) Vitamin D action and regulation of bone remodeling: suppression of osteoclastogenesis by the mature osteoblast. *Journal of Bone and Mineral Research* 21(10): 1618-1626.

Barnes GL, Einhorn TA. (2006) Enhancement of fracture healing with parathyroid hormone. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* 4(4): 269-275.

Barrios C, Broström L-Å, Stark A, Walheim G. (1993) Healing complications after internal fixation of trochanteric hip fractures: the prognostic value of osteoporosis. *Journal of orthopaedic trauma* 7(5): 438-442.

Beil FT, Barvencik F, Gebauer M, Seitz S, Rueger JM, Ignatius A, Pogoda P, Schinke T, Amling M. (2010) Effects of estrogen on fracture healing in mice. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 69(5): 1259-1265.

Beilfuss A, Sowa J-P, Sydor S, Beste M, Bechmann LP, Schlattjan M, Syn W-K, Wedemeyer I, Mathé Z, Jochum C. (2015) Vitamin D counteracts fibrogenic TGF- $\beta$  signalling in human hepatic stellate cells both receptor-dependently and independently. *Gut* 64(5): 791-799.

Bell NH, Shaw S, Turner R. (1984) Evidence that 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits the hepatic production of 25-hydroxyvitamin D in man. *Journal of Clinical Investigation* 74(4): 1540-1544.

Bellows C, Reimers S, Heersche J. (1999) Expression of mRNAs for type-I collagen, bone sialoprotein, osteocalcin, and osteopontin at different stages of osteoblastic differentiation and their regulation by 1, 25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Cell and tissue research* 297(2): 249-259.

Beresford J, Joyner C, Devlin C, Triffitt J. (1994) The effects of dexamethasone and 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on osteogenic differentiation of human marrow stromal cells in vitro. *Archives of Oral Biology* 39(11): 941-947.

Bielecki TS, Gazdzik T, Szczepanski T. (2008) Benefit of Percutaneous injection of Autologous Platelet-Leukocyte-Rich Gel in Patients with Delayed Union and Nonunion. *European Surgical Research* 40(3): 289-296.

Bischoff HA, Stahelin HB, Urscheler N, Ehrensam R, Vonthein R, Perrig-Chiello P, Tyndall A, Theiler R. (1999) Muscle strength in the elderly: its relation to vitamin D metabolites. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 80(1): 54-58.

Bobyn JD, McKenzie K, Karabasz D, Krygier JJ, Tanzer M. (2009) Locally delivered bisphosphonate for enhancement of bone formation and implant fixation. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 91(Supplement 6): 23-31.

Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. (2001) 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> has a direct effect on naive CD4<sup>+</sup> T cells to enhance the development of Th2 cells. *The Journal of Immunology* 167(9): 4974-4980.

Bouillon R, Reid IR. (2008) Vitamin D and its metabolites and analogs in the management of osteoporosis. In: Orwoll ES, Bilezikian JP and Vanderschueren D (eds). *Osteoporosis in Men*. Second Edition. Academic Press, San Diego (CA).

Bourque WT, Gross M, Hall B. (1993) A histological processing technique that preserves the integrity of calcified tissues (bone, enamel), yolky amphibian embryos, and growth factor antigens in skeletal tissue. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 41(9): 1429-1434.

Boyce BF, Xing L. (2007) The RANKL/RANK/OPG pathway. *Current osteoporosis reports* 5(3): 98-104.

Boyce R, Weisbrode S, Kindig O. (1985) Ultrastructural development of hyperostoidosis in 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-treated rats fed high levels of dietary calcium. *Bone* 6(3): 165-172.

Brandi ML. (2009) Microarchitecture, the key to bone quality. *Rheumatology* 48(suppl 4): iv3-iv8.

Brennan A, Katz D, Nunn J, Barker S, Hewison M, Fraher L, O'Riordan J. (1987) Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitamin D<sub>3</sub> metabolite, dihydroxycholecalciferol. *Immunology* 61(4): 457-461.

Brinker MR, O'Connor DP, Monla YT, Earthman TP. (2007) Metabolic and endocrine abnormalities in patients with nonunions. *Journal of orthopaedic trauma* 21(8): 557-570.

Brodie A. (1991) Aromatase and its inhibitors—an overview. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 40(1): 255-261.

Brown BN, Valentin JE, Stewart-Akers AM, McCabe GP, Badylak SF. (2009) Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials* 30(8): 1482-1491.

Brumbaugh PF, Speer DP, Pitt MJ. (1982) 1 alpha, 25-Dihydroxyvitamin D3 a metabolite of vitamin D that promotes bone repair. *The American journal of pathology* 106(2): 171-179.

Butcher C, Marsh D. (1996) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs delay tibial fracture union. *Injury* 27(5): 375.

Canetti ACV, Colombo CED, Chin CM, Faig-Leite H. (2009) Femur bone repair in ovariectomized rats under the local action of alendronate, hydroxyapatite and the association of alendronate and hydroxyapatite. *International journal of experimental pathology* 90(5): 520-526.

Cantorna MT, Woodward WD, Hayes CE, DeLuca HF. (1998) 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 is a positive regulator for the two anti-encephalitogenic cytokines TGF- $\beta$ 1 and IL-4. *The Journal of Immunology* 160(11): 5314-5319.

Cesnaja M, Stavljenic A, Vukicevic S. (1991) Decreased osteoinductive potential of bone matrix from ovariectomized rats. *Acta Orthopaedica* 62(5): 471-475.

Chalidis B, Tzioupis C, Tsiridis E, Giannoudis PV. (2007) Enhancement of fracture healing with parathyroid hormone: preclinical studies and potential clinical applications. *Expert opinion on investigational drugs* 16(4): 441-449.

Chen L, Yang X, Huang G, Song D, Ye XS, Xu H, W. L. (2013) Platelet-rich Plasma Promotes Healing of Osteoporotic Fractures. *Orthopedics* 36(6): e687-694.

Cipriano CA, Issack PS, Shindle L, Werner CM, Helfet DL, Lane JM. (2009) Recent advances toward the clinical application of PTH (1-34) in fracture healing. *HSS journal* 5(2): 149-153.

Civinini R, Macera A, Nistri L, Redl B, Innocenti M. (2011) The use of autologous blood-derived growth factors in bone regeneration. *Clinical cases in Mineral and Bone metabolism* 8(1): 25-31.

Clark R. (1996) *The molecular and cellular biology of wound repair* (Second ed). Springer Science & Business Media, New York.

Clarke B. (2008) Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology* 3(Supplement 3): S131-S139.

Cruess RL, Dumont J, Newton C. (1985) Healing of bone. In: Newton CD and Nunamaker DM (eds). *Textbook of small animal orthopaedics*. JB Lippincott Company, Philadelphia.

Dai K-R, Hao Y-Q. (2007) Quality of healing compared between osteoporotic fracture and normal traumatic fracture. In: Qin L, Genant HK, Griffith JF and Leung KS (eds). *Advanced Bioimaging Technologies in Assessment of the Quality of Bone and Scaffold Materials*. Springer.

Dallari D, Savarino L, Stagni C, Cenni E, Cenacchi A, Fornasari P, Albisinni U, Rimondi E, Baldini N, Giunti A. (2007) Enhanced tibial osteotomy healing with use of bone grafts supplemented with platelet gel or platelet gel and bone marrow stromal cells. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 89(11): 2413-2420.

Dambacher MA, Schacht E. (1996) *Osteoporosis and active vitamin D metabolites: the shape of things to come*. EULAR publ., Basel, Switzerland.

Datta NS. (2011) Osteoporotic fracture and parathyroid hormone. *World journal of orthopedics* 2(8): 67-74.

Davidge ST, Zhang Y, Stewart KG. (2001) A comparison of ovariectomy models for estrogen studies. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 280(3): R904-R907.

de Brito T, Franco M. (1994) Granulomatous inflammation. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 36(2): 185-192.

DeFife KM, Jenney CR, McNally AK, Colton E, Anderson JM. (1997) Interleukin-13 induces human monocyte/macrophage fusion and macrophage mannose receptor expression. *The Journal of Immunology* 158(7): 3385-3390.

Delgado-Martínez A, Martínez M, Carrascal M, Rodríguez-Avial M, Munuera L. (1998) Effect of 25-OH-vitamin D on fracture healing in elderly rats. *Journal of orthopaedic research* 16(6): 650-653.

Della Rocca GJ, Crist BD, Murtha YM. (2010) Parathyroid hormone: is there a role in fracture healing? *Journal of orthopaedic trauma* 24: S31-S35.

DeLuca HF. (2004) Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American journal of clinical nutrition* 80(6): 1689S-1696S.

DeLuca HF, Cantorna MT. (2001) Vitamin D: its role and uses in immunology. *The FASEB journal* 15(14): 2579-2585.

Dempster D, Shane E, Horbert W, Lindsay R. (1986) A simple method for correlative light and scanning electron microscopy of human iliac crest bone biopsies: qualitative observations in normal and osteoporotic subjects. *Journal of Bone and Mineral Research* 1(1): 15-21.

Dempster DW, Lian J, Goldring S. (2006) Anatomy and functions of the adult skeleton. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism* 6: 7-11.

Dick I, Devine A, Beilby J, Prince R. (2005) Effects of endogenous estrogen on renal calcium and phosphate handling in elderly women. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 288(2): E430-E435.

Dion N, Ste-Marie L. (2012) The fragile beauty of bone architecture. *Medicographia* 34: 163-169.

Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL. (2003) Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *Journal of Clinical Investigation* 111(8): 1221-1230.

Einhorn TA. (2010) Can an anti-fracture agent heal fractures? *Clinical cases in Mineral and Bone metabolism* 7(1): 11-13.

Eisman JA, Bouillon R. (2014) Vitamin D: direct effects of vitamin D metabolites on bone: lessons from genetically modified mice. *BoneKEy reports* 3: 499.

- Ellegaard M, Jørgensen N, Schwarz P. (2010) Parathyroid hormone and bone healing. *Calcified tissue international* 87(1): 1-13.
- Epstein FH, Border WA, Noble NA. (1994) Transforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis. *New England Journal of Medicine* 331(19): 1286-1292.
- Erben R. (2001) Vitamin D analogs and bone. *JOURNAL OF MUSCULOSKELETAL AND NEURONAL INTERACTIONS* 2(1): 59-70.
- Erben RG, Mosekilde L, Thomsen JS, Weber K, Stahr K, Leyshon A, Smith SY, Phipps R. (2002) Prevention of Bone Loss in Ovariectomized Rats by Combined Treatment With Risedronate and  $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Journal of Bone and Mineral Research* 17(8): 1498-1511.
- Erben RG, Scutt AM, Miao D, Kollenkirchen U, Haberey M. (1997) Short-Term Treatment of Rats with High Dose  $1, 25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Stimulates Bone Formation and Increases the Number of Osteoblast Precursor Cells in Bone Marrow 1. *Endocrinology* 138(11): 4629-4635.
- Estai MA, Suhaimi F, Das S, Shuid AN, Mohamed Z, Soelaiman I-N. (2011) Expression of TGF- $\beta$ 1 in the blood during fracture repair in an estrogen-deficient rat model. *Clinics* 66(12): 2113-2119.
- Feldman D, Malloy P, Krishnan A, Balint E. (2007) Vitamin D: biology, action and clinical implications. *Osteoporosis* 1: 317-382.
- Feng Y, Sun Y, Jia W, Zhang C. (2010) Platelet-rich plasma and  $1, 25$  (OH)  $2$  vitamin D<sub>3</sub> synergistically stimulate osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *Biotechnology letters* 32(5): 635-642.
- Finkelman RD, Linkhart TA, Mohan S, Lau K, Baylink DJ, Bell NH. (1991) Vitamin D deficiency causes a selective reduction in deposition of transforming growth factor beta in rat bone: possible mechanism for impaired osteoinduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(9): 3657-3660.
- Finkemeier CG. (2002) Bone-grafting and bone-graft substitutes. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 84(3): 454-464.
- Flanders K, Sato M, Ooshima A, Russo A, Roberts A. (2004) Smad-3 as a mediator of the fibrotic response. *International journal of experimental pathology* 85(1): A13-A13.
- Fleisch H. (2001) Can bisphosphonates be given to patients with fractures? *Journal of Bone and Mineral Research* 16(3): 437-440.
- Franceschi RT, Li Y. (2011) Vitamin D regulation of osteoblast function. In: Feldman D, Pike J and Adams J (eds). *Vitamin D: Third Edition*. Elsevier/Academic Press, San Diego.
- Franz S, Rammelt S, Scharnweber D, Simon JC. (2011) Immune responses to implants—a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials* 32(28): 6692-6709.
- Fröhlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobic M, Vunjak-Novakovic G. (2008) Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Current stem cell research & therapy* 3(4): 254-264.

Fromigué O, Modrowski D, Marie PJ. (2004) Growth factors and bone formation in osteoporosis: roles for fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. *Current pharmaceutical design* 10(21): 2593-2603.

Fu L, Tang T, Miao Y, Hao Y, Dai K. (2009) Effect of 1,25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> on fracture healing and bone remodeling in ovariectomized rat femora. *Bone* 44(5): 893-898.

Gale SK, Sclafani A. (1977) Comparison of ovarian and hypothalamic obesity syndromes in the female rat: Effects of diet palability on food intake and body weight. *Journal of comparative and physiological psychology* 91(2): 381-392.

Gallagher J, Goldgar D. (1990) Treatment of postmenopausal osteoporosis with high doses of synthetic calcitriol: a randomized controlled study. *Annals of internal medicine* 113(9): 649-655.

Gascon-Barre M, Feldman D. (1997) The vitamin D 25-hydroxylase. In: Feldman D, Glorieux F and Pike J (eds). *Vitamin D*. Academic Press, San Diego.

Gennari C, Agnusdei D, Nardi P, Civitelli R. (1990) Estrogen Preserves a Normal Intestinal Responsiveness to 1, 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in Oophorectomized Women\*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 71(5): 1288-1293.

Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. (2003) Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of cellular biochemistry* 88(5): 873-884.

Giannotti S, Bottai V, Dell'Osso G, Pini E, De Paola G, Bugelli G, Guido G. (2013) Current medical treatment strategies concerning fracture healing. *Clinical cases in Mineral and Bone metabolism* 10(2): 116-120.

Girasole G, Jilka R, Passeri G, Boswell S, Boder G, Williams D, Manolagas S. (1992) 17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *Journal of Clinical Investigation* 89(3): 883-891.

Goldhahn J, Little D, Mitchell P, Fazzalari N, Reid IR, Aspenberg P, Marsh D. (2010) Evidence for anti-osteoporosis therapy in acute fracture situations—recommendations of a multidisciplinary workshop of the International Society for Fracture Repair. *Bone* 46(2): 267-271.

Goldhahn J, Suhm N, Goldhahn S, Blauth M, Hanson B. (2008) Influence of osteoporosis on fracture fixation—a systematic literature review. *Osteoporosis international* 19(6): 761-772.

Goodship A, Walker P, McNally D, Chambers T, Green J. (1993) Use of a bisphosphonate (pamidronate) to modulate fracture repair in ovine bone. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology/ESMO* 5: S53-5.

Gorter EA, Hamdy NA, Appelman-Dijkstra NM, Schipper IB. (2014) The role of vitamin D in human fracture healing: a systematic review of the literature. *Bone* 64: 288-297.

Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, Smioldo S, Davalli AM, Adorini L. (2001) Regulatory T cells induced by 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *The Journal of Immunology* 167(4): 1945-1953.

Guo D, Xu K, Zhao X, Han Y. (2005) Development of a strontium-containing hydroxyapatite bone cement. *Biomaterials* 26(19): 4073-4083.

Hagen A, Gorenai V, Schönermark MP. (2012) Bone graft substitutes for the treatment of traumatic fractures of the extremities. *GMS health technology assessment* 8.

Hanna R, Trejo PM, Weltman RL. (2004) Treatment of intrabony defects with bovine-derived xenograft alone and in combination with platelet-rich plasma: a randomized clinical trial. *Journal of periodontology* 75(12): 1668-1677.

Harada S, Mizoguchi T, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Takeda S, Sakai S, Takahashi F, Saito H, Yasuda H, Udagawa N. (2012) Daily administration of eldcalcitol (ED-71), an active vitamin D analog, increases bone mineral density by suppressing RANKL expression in mouse trabecular bone. *Journal of Bone and Mineral Research* 27(2): 461-473.

Haussler M, Haussler C, Jurutka P, Thompson P, Hsieh J, Remus L, Selznick S, Whitfield G. (1997) The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *Journal of Endocrinology* 154(3 Suppl): S57-S73.

Hewison M, Adams J. (2005) Extra-renal 1 $\alpha$ -hydroxylase activity and human disease. *Vitamin D* 79: 1379-400.

Hildebolt C. (1997) Osteoporosis and oral bone loss. *Dentomaxillofacial Radiology* 26(1): 3-15.

Hilding M, Aspenberg P. (2007) Local peroperative treatment with a bisphosphonate improves the fixation of total knee prostheses: a randomized, double-blind radiostereometric study of 50 patients. *Acta Orthopaedica* 78(6): 795-799.

Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. (1999) Estrogen Stimulates Gene Expression and Protein Production of Osteoprotegerin in Human Osteoblastic Cells\*. *Endocrinology* 140(9): 4367-4370.

Hollinger JO, Onikepe AO, MacKrell J, Einhorn T, Bradica G, Lynch S, Hart CE. (2008) Accelerated fracture healing in the geriatric, osteoporotic rat with recombinant human platelet-derived growth factor-bb and an injectable beta-tricalcium phosphate/collagen matrix. *Journal of orthopaedic research* 26(1): 83-90.

Hollinger JO, Onikepe AO, MacKrell J, Einhorn T, Bradica G, Lynch S, Hart CE. (2008) Accelerated fracture healing in the geriatric, osteoporotic rat with recombinant human platelet-derived growth factor-bb and an injectable beta-tricalcium phosphate/collagen matrix. *Journal of orthopaedic research* 26(1): 83-90.

Holzer G, Majeska RJ, Lundy MW, Hartke JR, Einhorn TA. (1999) Parathyroid Hormone Enhances Fracture Healing: A Preliminary Report. *Clinical orthopaedics and related research* 366: 258-263.

Hopkins MH, Owen J, Ahearn T, Fedirko V, Flanders WD, Jones DP, Bostick RM. (2011) Effects of supplemental vitamin D and calcium on biomarkers of inflammation in colorectal adenoma patients: a randomized, controlled clinical trial. *Cancer Prevention Research* 4(10): 1645-1654.

Horst RL, Reinhardt TA, Reddy GS. (2005) Vitamin D metabolism. *Vitamin D* 1: 15-36.



Hou N, Zhu Y, Huang H. (2006) [The expression of estrogen receptor alpha and beta in the intervention of different estrogens in rat bone metabolism]. *Fen zi xi bao sheng wu xue bao*= *Journal of molecular cell biology/Zhongguo xi bao sheng wu xue xue hui zhu ban* 39(4): 289-296.

Howard D, Buttery LD, Shakesheff KM, Roberts SJ. (2008) Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *Journal of anatomy* 213(1): 66-72.

Howard GA, Turner R, Sherrard D, Baylink DJ. (1981) Human bone cells in culture metabolize 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> to 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 24, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Journal of Biological Chemistry* 256(15): 7738-7740.

Hsu J-T, Chen Y-J, Ho J-T, Huang H-L, Wang S-P, Cheng F-C, Wu J, Tsai M-T. (2014) A comparison of micro-CT and dental CT in assessing cortical bone morphology and trabecular bone microarchitecture.

Hullett DA, Cantorna MT, Redaelli C, Humpal-Winter J, Hayes CE, Sollinger HW, Deluca HF. (1998) PROLONGATION OF ALLOGRAFT SURVIVAL BY 1, 25-DIHYDROXYVITAMIN D<sub>3</sub>. *Transplantation* 66(7): 824-828.

Ichikawa F SK, Nanjo M, Nishii Y, Shinki T, Takahashi N, Suda T. (1995) Mouse primary osteoblasts express vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase mRNA and convert 1 alpha-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> into 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Bone* 16: 129-135.

Ignjatović N, Uskoković V, Ajduković Z, Uskoković D. (2013) Multifunctional hydroxyapatite and poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for the local delivery of cholecalciferol. *Materials Science and Engineering: C* 33(2): 943-950.

Intini G, Andreana S, Intini FE, Buhite RJ, Bobek LA. (2007) Calcium sulfate and platelet-rich plasma make a novel osteoinductive biomaterial for bone regeneration. *Journal of Translational Medicine* 5: 13.

Ito I, Waku T, Aoki M, Abe R, Nagai Y, Watanabe T, Nakajima Y, Ohkido I, Yokoyama K, Miyachi H. (2013) A nonclassical vitamin D receptor pathway suppresses renal fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 123(11): 4579-4594.

Iwamoto J, Seki A, Takeda T, Sato Y, Yamada H, Yeh JK. (2006) Comparative effects of alendronate and alfacalcidol on cancellous and cortical bone mass and bone mechanical properties in ovariectomized rats. *Experimental animals* 55(4): 357-367.

Jackson RD, LaCroix AZ, Gass M, Wallace RB, Robbins J, Lewis CE, Bassford T, Beresford SA, Black HR, Blanchette P. (2006) Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. *New England Journal of Medicine* 354(7): 669-683.

Jahng JS, Kim HW. (2000) Effect of intermittent administration of parathyroid hormone on fracture healing in ovariectomized rats. *Orthopedics* 23(10): 1089-1094.

James DG, Zumla A. (1999) *The granulomatous disorders*. Cambridge University Press,

Jee W, Yao W. (2001) Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1(3): 193-207.

Jiang Y, Zhao J, Genant HK, Dequeker J, Geusens P. (1997) Long-Term Changes in Bone Mineral and Biomechanical Properties of Vertebrae and Femur in Aging, Dietary

Calcium Restricted, and/or Estrogen-Deprived/-Replaced Rats. *Journal of Bone and Mineral Research* 12(5): 820-831.

Jilka RL. (2007) Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone* 40(6): 1434-1446.

Jingushi S, Iwaki A, Higuchi O, Azuma Y, Ohta T, Shida J-I, Izumi T, Ikenoue T, Sugioka Y, Iwamoto Y. (1998) Serum  $1\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> accumulates into the fracture callus during rat femoral fracture healing. *Endocrinology* 139(4): 1467-1473.

Jirapongsananuruk O, Melamed I, Leung DY. (2000) Additive immunosuppressive effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and corticosteroids on TH 1, but not TH 2, responses. *Journal of allergy and clinical immunology* 106(5): 981-985.

Johnson-Lynn S, Francis R, McCaskie A. (2008) Osteoporosis treatments and their effect on fracture healing. *Current Orthopaedics* 22(5): 336-340.

Johnston BD, Ward WE. (2015) The Ovariectomized Rat as a Model for Studying Alveolar Bone Loss in Postmenopausal Women. *BioMed Research International*.

Jones G. (2012) Vitamin D analogs. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 38(1): 207-232.

Jones G, Strugnell SA, DeLUCA HF. (1998) Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiological reviews* 78(4): 1193-1231.

Kakar S, Little D, Einhorn TA. (2009) Can we improve fixation and outcomes in the treatment of femoral neck fractures? The use of pharmaceuticals. *Journal of orthopaedic trauma* 23(6): 413-421.

Kalpakcioglu BB, Morshed S, Engelke K, Genant HK. (2008) Advanced imaging of bone macrostructure and microstructure in bone fragility and fracture repair. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 90(Supplement 1): 68-78.

Kanthan S, Kavitha G, Addi S, Choon D, Kamarul T. (2011) Platelet-rich plasma (PRP) enhances bone healing in non-united critical-sized defects: a preliminary study involving rabbit models. *Injury* 42(8): 782-789.

Kao WJ, McNally AK, Hiltner A, Anderson JM. (1995) Role for interleukin-4 in foreign-body giant cell formation on a poly (etherurethane urea) in vivo. *Journal of biomedical materials research* 29(10): 1267-1275.

Kasono K, Sato K, Sato Y, Tsushima T, Shizume K, Demura H. (1993) Inhibitory effect of interleukin-4 on osteoclast-like cell formation in mouse bone marrow culture. *Bone and mineral* 21(3): 179-188.

Kasten P, Vogel J, Geiger F, Niemeyer P, Luginbühl R, Szalay K. (2008) The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials* 29(29): 3983-3992.

Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, Laurencin CT. (2008) Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 90(Supplement 1): 36-42.

Khojasteh A, Behnia H, Naghdi N, Esmaeelinejad M, Alikhassy Z, Stevens M. (2013) Effects of different growth factors and carriers on bone regeneration: a systematic review. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* 116(6): e405-e423.

Khosla S. (2001) Minireview: The opg/rankl/rank system. *Endocrinology* 142(12): 5050-5055.

Kim JS, Lee SW, Kim SK, Na SW, Kim YO. (2014) Osteoprotective effect of extract from *Achyranthes japonica* in ovariectomized rats. *Journal of Exercise Rehabilitation* 10(6): 372-379.

Kim SG, Chung CH, Kim YK, Park JC, Lim SC. (2002) The use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 17(1): 86-94.

Kimble RB, Srivastava S, Ross FP, Matayoshi A, Pacifici R. (1996) Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis via an interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production. *Journal of Biological Chemistry* 271(46): 28890-28897.

Kitazawa R, Kitazawa S. (2002) Vitamin D<sub>3</sub> augments osteoclastogenesis via vitamin D-responsive element of mouse RANKL gene promoter. *Biochemical and biophysical research communications* 290(2): 650-655.

Kleiman MB, Elfenbein DS, Wolf EL, Hemphill M, Kurlinski JP. (1977) Periosteal reaction due to foreign body-induced inflammation of soft tissue. *Pediatrics* 60(4): 638-641.

Kolios L, Hoerster AK, Sehmisch S, Malcherek MC, Rack T, Tezval M, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK. (2010) Do estrogen and alendronate improve metaphyseal fracture healing when applied as osteoporosis prophylaxis? *Calcified tissue international* 86(1): 23-32.

Komatsubara S, Mori S, Mashiba T, Nonaka K, Seki A, Akiyama T, Miyamoto K, Cao Y, Manabe T, Norimatsu H. (2005) Human parathyroid hormone (1-34) accelerates the fracture healing process of woven to lamellar bone replacement and new cortical shell formation in rat femora. *Bone* 36(4): 678-687.

Kommenou A, Karayannopoulou M, Polizopoulou Z, Constantinidis T, Dessiris A. (2005) Correlation of serum alkaline phosphatase activity with the healing process of long bone fractures in dogs. *Veterinary Clinical Pathology* 34(1): 35-38.

Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, Yoshioka M, Honjo H, Urabe M, Kitajima I, Semba I, Hirasawa Y. (1999) Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 68(5): 197-202.

Kwan TS, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. (2004) IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine & growth factor reviews* 15(1): 49-60.

Kyllönen L, D'Este M, Alini M, Eglin D. (2015) Local drug delivery for enhancing fracture healing in osteoporotic bone. *Acta biomaterialia* 11: 412-434.

Laird E, McNulty H, Ward M, Hoey L, McSorley E, Wallace J, Carson E, Molloy A, Healy M, Casey M. (2014) Vitamin D deficiency is associated with inflammation in older Irish adults. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 99(5): 1807-1815.

Larsson P, Mattsson L, Klareskog L, Johnsson C. (1998) A vitamin D analogue (MC 1288) has immunomodulatory properties and suppresses collagen-induced arthritis (CIA) without causing hypercalcaemia. *Clinical and experimental immunology* 114: 277-283.

Lasota A, Danowska-Klonowska D. (2004) Experimental osteoporosis-different methods of ovariectomy in female white rats. *Rocz Akad Med Bialymst* 49(Suppl 1): 129-31.

Lau K-H, Baylink D. (1999) Vitamin D therapy of osteoporosis: plain vitamin D therapy versus active vitamin D analog (D-hormone) therapy. *Calcified tissue international* 65(4): 295-306.

Lee J, Ko I, Jeon S, Chae J, Lee E, Chang J. 2011. Localized drugs delivery hydroxyapatite microspheres for osteoporosis therapy. Paper read at SPIE 8099, Biosensing and Nanomedicine IV, 80990K (13 September 2011); doi: 10.1117/12.893014.

Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. (2008) The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comparative medicine* 58(5): 424-430.

Lemire J, Archer C, Beck L, Spiegelberg H. (1995) Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: Preferential inhibition of Th1 functions. *Journal of Nutrition* 125(6): 1704S-1708S.

Lemire JM, Adams J, Sakai R, Jordan S. (1984) 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Clinical Investigation* 74(2): 657-661.

Lemire JM, Archer DC. (1991) 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Clinical Investigation* 87(3): 1103-1107.

Lerner UH. (2006) Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *Journal of Dental Research* 85(7): 584-595.

Li J, Byrne ME, Chang E, Jiang Y, Donkin SS, Buhman KK, Burgess JR, Teegarden D. (2008) 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D hydroxylase in adipocytes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 112(1): 122-126.

Li J, Dai W, Dong J. (2008) [Progresses in bone tissue engineering]. *Zhongguo gu shang= China journal of orthopaedics and traumatology* 21(11): 880-882.

Li M, Li Y, Healy D, Simmons H, Ke H, Thompson D. (2003) Alfacalcidol restores cancellous bone in ovariectomized rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 3(1): 39-46.

Li M, Liu X, Liu X, Ge B. (2010) Calcium phosphate cement with BMP-2-loaded gelatin microspheres enhances bone healing in osteoporosis: a pilot study. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 468(7): 1978-1985.

Li M, Shen Y, Wronski T. (1997) Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 20(1): 55-61.

Lips P, Bouillon R, Van Schoor NM, Vanderschueren D, Verschueren S, Kuchuk N, Milisen K, Boonen S. (2010) Reducing fracture risk with calcium and vitamin D. *Clinical endocrinology* 73(3): 277-285.

Liu H-Y, Wu AT, Tsai C-Y, Chou K-R, Zeng R, Wang M-F, Chang W-C, Hwang S-M, Su C-H, Deng W-P. (2011) The balance between adipogenesis and osteogenesis in bone regeneration by platelet-rich plasma for age-related osteoporosis. *Biomaterials* 32(28): 6773-6780.

Liu H, Huang H, Li B, Wu D, Wang F, Hua Zheng X, Chen Q, Wu B, Fan X. (2014) Olive oil in the prevention and treatment of osteoporosis after artificial menopause. *Clinical interventions in aging* 9: 2087.

Lopez MJ, Edwards IIRB, Markel MD. (2003) Healing of normal and osteoporotic bone. In: An YH (eds). *Orthopaedic issues in osteoporosis*. CRC Press, Boca Raton.

Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. (2008) Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocrine reviews* 29(4): 403-440.

Lorenzo JA, Naprta A, Rao Y, Alander C, Glaccum M, Widmer M, Gronowicz G, Kalinowski J, Pilbeam CC. (1998) Mice lacking the type I interleukin-1 receptor do not lose bone mass after ovariectomy. *Endocrinology* 139(6): 3022-3025.

Lyritys G. (2010) Fracture healing and antiosteoporotic treatments. *Medicographia* 32(1): 79-85.

Majumdar S, Genant H, Grampp S, Newitt D, Truong VH, Lin J, Mathur A. (1997) Correlation of trabecular bone structure with age, bone mineral density, and osteoporotic status: in vivo studies in the distal radius using high resolution magnetic resonance imaging. *Journal of Bone and Mineral Research* 12(1): 111-118.

Marcus R. (2011) Present at the beginning: a personal reminiscence on the history of teriparatide. *Osteoporosis international* 22(8): 2241-2248.

Mark Fisher D, Min-Leong Wong J, Crowley C, S Khan W. (2013) Preclinical and clinical studies on the use of growth factors for bone repair: a systematic review. *Current stem cell research & therapy* 8(3): 260-268.

Marsell R, Einhorn TA. (2011) The biology of fracture healing. *Injury* 42(6): 551-555.

Marx RE. (2004) Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of oral and maxillofacial surgery* 62(4): 489-496.

Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. (1998) Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 85(6): 638-646.

Mashiba T, Mori S. (2009) [Bone fracture and the healing mechanisms. The effects of anti-resorptive agents on fracture healing]. *Clinical calcium* 19(5): 673-679.

Mason SS, Kohles SS, Winn SR, Zelick RD. (2013) Extrahepatic 25-Hydroxylation of Vitamin D 3 in an Engineered Osteoblast Precursor Cell Line Exploring the Influence on Cellular Proliferation and Matrix Maturation during Bone Development. *ISRN Biomedical Engineering*. doi:10.1155/2013/956362.

Mathieu C, Adorini L. (2002) The coming of age of 1, 25-dihydroxyvitamin D 3 analogs as immunomodulatory agents. *Trends in molecular medicine* 8(4): 174-179.

Mathieu C, Waer M, Casteels K, Laureys J, Bouillon R. (1995) Prevention of type I diabetes in NOD mice by nonhypercalcemic doses of a new structural analog of 1, 25-dihydroxyvitamin D3, KH1060. *Endocrinology* 136(3): 866-872.

Matsumoto T, Ito M, Hayashi Y, Hirota T, Tanigawara Y, Sone T, Fukunaga M, Shiraki M, Nakamura T. (2011) A new active vitamin D 3 analog, eldecalcitol, prevents the risk of osteoporotic fractures—a randomized, active comparator, double-blind study. *Bone* 49(4): 605-612.

Matsumoto T, Miki T, Hagino H, Sugimoto T, Okamoto S, Hirota T, Tanigawara Y, Hayashi Y, Fukunaga M, Shiraki M. (2005) A new active vitamin D, ED-71, increases bone mass in osteoporotic patients under vitamin D supplementation: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90(9): 5031-5036.

Matsumoto T, Takano T, Yamakido S, Takahashi F, Tsuji N. (2010) Comparison of the effects of eldecalcitol and alfacalcidol on bone and calcium metabolism. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 121(1): 261-264.

McKee M, Nanci A. (1996) Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microscopy research and technique* 33(2): 141-164.

McLean IW, Nakane PK. (1974) Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative a new fixative for immunoelectron microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 22(12): 1077-1083.

McNally AK, Anderson JM. (1995) Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells. *The American journal of pathology* 147(5): 1487.

Mellado-Valero A, Ferrer-García JC, Calvo-Catalá J, Labaig-Rueda C. (2010) Implant treatment in patients with osteoporosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 15(1): e52-57.

Melton JL. (1995) Perspectives: how many women have osteoporosis now? *Journal of Bone and Mineral Research* 10(2): 175-177.

Miao D, Scutt A. (2002) Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 50(3): 333-340.

Mori S, Sawai T, Teshima T, Kyogoku M. (1988) A new decalcifying technique for immunohistochemical studies of calcified tissue, especially applicable to cell surface marker demonstration. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 36(1): 111-114.

Morris HA, Anderson PH. (2010) Autocrine and paracrine actions of vitamin D. *The Clinical Biochemist Reviews* 31(4): 129-138.

Mountziaris PM, Mikos AG. (2008) Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 14(2): 179-186.

Müller K, Diamant M, Bendtzen K. (1991) Inhibition of production and function of interleukin-6 by 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Immunology letters* 28(2): 115-120.

Murayama A, Takeyama K-i, Kitanaka S, Kadera Y, Kawaguchi Y, Hosoya T, Kato S. (1999) Positive and Negative Regulations of the Renal 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -Hydroxylase Gene by Parathyroid Hormone, Calcitonin, and 1 $\alpha$ , 25 (OH) 2D<sub>3</sub> in Intact Animals 1. *Endocrinology* 140(5): 2224-2231.

Nagaoka H, Mochida Y, Atsawasuwan P, Kaku M, Kondoh T, Yamauchi M. (2008) 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> regulates collagen quality in an osteoblastic cell culture system. *Biochemical and biophysical research communications* 377(2): 674-678.

Nakagawa H, Kamimura M, Takahara K, Hashidate H, Kawaguchi A, Uchiyama S, Miyasaka T. (2006) Changes in total alkaline phosphatase level after hip fracture: comparison between femoral neck and trochanter fractures. *Journal of Orthopaedic Science* 11(2): 135-139.

Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Hao Lin J, Maastricht S, Swain M, Mason R, Murrell G, Diwan A, Diamond T. (2001) Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone* 28(1): 80-86.

Narbaitz R, Stumpf W, Sar M, Huang S, DeLuca H. (1983) Autoradiographic localization of target cells for 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in bones from fetal rats. *Calcified tissue international* 35(1): 177-182.

Navarro M, Michiardi A, Castano O, Planell J. (2008) Biomaterials in orthopaedics. *Journal of the Royal Society Interface* 5(27): 1137-1158.

Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster J-Y, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK. (2001) Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *New England Journal of Medicine* 344(19): 1434-1441.

Nelson LR, Bulun SE. (2001) Estrogen production and action. *Journal of the American Academy of Dermatology* 45(3): S116-S124.

Ng AJH, Yue B, Joseph S, Richardson M. (2014) Delayed/non-union of upper limb fractures with bisphosphonates: systematic review and recommendations. *ANZ journal of surgery* 84(4): 218-224.

Nikolaou V, Lindner T, Kanakaris N, Giannoudis P. (2010) IS FRACTURE HEALING DELAYED IN OSTEOPOROTIC PATIENTS? *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume* 92(SUPP II): 332-332.

Nikolaou VS, Efstathopoulos N, Kontakis G, Kanakaris NK, Giannoudis PV. (2009) The influence of osteoporosis in femoral fracture healing time. *Injury* 40(6): 663-668.

Nordin BEC, Need AG, Morris HA, Horowitz M. (1999) The Special Role of "Hormonal" Forms of Vitamin D in the Treatment of Osteoporosis. *Calcified tissue international* 65(4): 307-310.

Nozaka K, Miyakoshi N, Kasukawa Y, Maekawa S, Noguchi H, Shimada Y. (2008) Intermittent administration of human parathyroid hormone enhances bone formation and union at the site of cancellous bone osteotomy in normal and ovariectomized rats. *Bone* 42(1): 90-97.

Nuti R, Bianchi G, Brandi M, Caudarella R, D'Erasmus E, Fiore C, Isaia G, Luisetto G, Muratore M, Ortolani S. (2006) Superiority of alfacalcidol compared to vitamin D plus calcium in lumbar bone mineral density in postmenopausal osteoporosis. *Rheumatology international* 26(5): 445-453.

O'Loughlin PD, Morris HA. (1998) Oestrogen deficiency impairs intestinal calcium absorption in the rat. *The Journal of physiology* 511(1): 313-322.

Okuda K, Tai H, Tanabe K, Suzuki H, Sato T, Kawase T, Saito Y, Wolff LF, Yoshiex H. (2005) Platelet-rich plasma combined with a porous hydroxyapatite graft for the treatment of intrabony periodontal defects in humans: a comparative controlled clinical study. *Journal of periodontology* 76(6): 890-898.

Onoe Y, Miyaura C, Ohta H, Nozawa S, Suda T. (1997) Expression of estrogen receptor  $\beta$  in rat bone. *Endocrinology* 138(10): 4509-4512.

Orimo H, Shiraki M, Hayashi Y, Hoshino T, Onaya T, Miyazaki S, Kurosawa H, Nakamura T, Ogawa N. (1994) Effects of  $1\alpha$ -hydroxyvitamin D<sub>3</sub> on lumbar bone mineral density and vertebral fractures in patients with postmenopausal osteoporosis. *Calcified tissue international* 54(5): 370-376.

Orsini G, Scarano A, Degidi M, Caputi S, Iezzi G, Piattelli A. (2007) Histological and ultrastructural evaluation of bone around Bio-Oss® particles in sinus augmentation. *Oral diseases* 13(6): 586-593.

Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL, Spelsberg TC. (1991) Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(15): 6613-6617.

Overbergh L, Decallonne B, Valckx D, Verstuyf A, Depovere J, Laureys J, Rutgeerts O, Saint-Arnaud R, Bouillon R, Mathieu C. (2000) Identification and immune regulation of 25-hydroxyvitamin D-1- $\alpha$ -hydroxylase in murine macrophages. *Clinical & Experimental Immunology* 120(1): 139-146.

Overbergh L, Decallonne B, Waer M, Rutgeerts O, Valckx D, Casteels KM, Laureys J, Bouillon R, Mathieu C. (2000)  $1\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> induces an autoantigen-specific T-helper 1/T-helper 2 immune shift in NOD mice immunized with GAD65 (p524-543). *Diabetes* 49(8): 1301-1307.

Ozeki K, Aoki H, Fukui Y. (2008) The effect of adsorbed vitamin D and K to hydroxyapatite on ALP activity of MC3T3-E1 cell. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19(4): 1753-1757.

Pacifici R. (1996) Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 11(8): 1043-1051.

Pacifici R, Brown C, Puscheck E, Friedrich E, Slatopolsky E, Maggio D, McCracken R, Avioli LV. (1991) Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine



release from human blood mononuclear cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(12): 5134-5138.

Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. (2002) IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF- $\kappa$ B in mouse calvariae. *The Journal of Immunology* 169(6): 3353-3362.

Park SB, Lee YJ, Chung CK. (2010) Bone mineral density changes after ovariectomy in rats as an osteopenic model: stepwise description of double dorso-lateral approach. *Journal of Korean Neurosurgical Society* 48(4): 309-312.

Park SB, Park SH, Kim N-H, Chung CK. (2013) BMP-2 induced early bone formation in spine fusion using rat ovariectomy osteoporosis model. *The Spine Journal* 13(10): 1273-1280.

Passeri G, Girasole G, Jilka RL, Manolagas SC. (1993) Increased interleukin-6 production by murine bone marrow and bone cells after estrogen withdrawal. *Endocrinology* 133(2): 822-828.

Pesce V, Speciale D, Sammarco G, Patella S, Spinarelli A, Patella V. (2009) Surgical approach to bone healing in osteoporosis. *Clinical cases in Mineral and Bone metabolism* 6(2): 131-135.

Peter C, Cook WO, Nunamaker DM, Provost MT, Seedor JG, Rodan GA. (1996) Effect of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs. *Journal of orthopaedic research* 14(1): 74-79.

Piemonti L, Monti P, Sironi M, Fraticelli P, Leone BE, Dal Cin E, Allavena P, Di Carlo V. (2000) Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *The Journal of Immunology* 164(9): 4443-4451.

Poli V, Balena R, Fattori E, Markatos A, Yamamoto M, Tanaka H, Ciliberto G, Rodan G, Costantini F. (1994) Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *The EMBO journal* 13(5): 1189-1196.

Pountos I, Georgouli T, Henshaw K, Bird H, Jones E, Giannoudis PV. (2010) The effect of bone morphogenetic protein-2, bone morphogenetic protein-7, parathyroid hormone, and platelet-derived growth factor on the proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from osteoporotic bone. *Journal of orthopaedic trauma* 24(9): 552-556.

Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. (1983) 1, 25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. *Science* 221(4616): 1181-1183.

Pyo SW, Kim YM, Kim CS, Lee IS, Park JU. (2013) Bone formation on biomimetic calcium phosphate-coated and zoledronate-immobilized titanium implants in osteoporotic rat tibiae. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 29(2): 478-484.

Qiao L, Xu K, Liu H, Liu H. (2005) [Effects of ovariectomy on fracture healing in female rats]. *Sichuan da xue xue bao. Yi xue ban= Journal of Sichuan University. Medical science edition* 36(1): 108-111.

Raggatt LJ, Wullschleger ME, Alexander KA, Wu AC, Millard SM, Kaur S, Maugham ML, Gregory LS, Steck R, Pettit AR. (2014) Fracture healing via periosteal callus formation requires macrophages for both initiation and progression of early endochondral ossification. *The American journal of pathology* 184(12): 3192-3204.

Rahnama M, Swiatkowski W. (2002) Effect of ovariectomy on biochemical markers of bone turnover (ALP, ACP) and calcium content in rat mandible and teeth. *BULLETIN-VETERINARY INSTITUTE IN PULAWY* 46(2): 281-288.

Rai B, Oest ME, Dupont KM, Ho KH, Teoh SH, Guldberg RE. (2007) Combination of platelet-rich plasma with polycaprolactone-tricalcium phosphate scaffolds for segmental bone defect repair. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 81(4): 888-899.

Raisz L, Trummel C, Holick M, DeLuca HL. (1972) 1, 25-Dihydroxycholecalciferol: a potent stimulator of bone resorption in tissue culture. *Science* 175(4023): 768-769.

Riggs BL. (2000) The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *Journal of Clinical Investigation* 106(10): 1203-1204.

Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. (1998) A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *Journal of Bone and Mineral Research* 13(5): 763-773.

Riggs BL, Parfitt AM. (2005) Drugs used to treat osteoporosis: the critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling. *Journal of Bone and Mineral Research* 20(2): 177-184.

Ringe J, Dorst A, Faber H, Schacht E, Rahlfs V. (2004) Superiority of alfacalcidol over plain vitamin D in the treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology international* 24(2): 63-70.

Ringe JD. (2006) *Alfacalcidol in Prevention and Treatment of All Major Forms of Osteoporosis and in Renal Osteopathy*. Georg Thieme Verlag,

Ringe JD, Schacht E. (2004) Prevention and therapy of osteoporosis: the roles of plain vitamin D and alfacalcidol. *Rheumatology international* 24(4): 189-197.

Rodríguez JP, Garat S, Gajardo H, Pino AM, Seitz G. (1999) Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cells dynamics. *Journal of cellular biochemistry* 75(3): 414-423.

Rodriguez WJ, Gromelski J. (2013) Vitamin d status and spine surgery outcomes. *ISRN Orthopedics*. doi:10.1155/2013/471695.

Roffi A, Filardo G, Kon E, Marcacci M. (2013) Does PRP enhance bone integration with grafts, graft substitutes, or implants? A systematic review. *BMC musculoskeletal disorders* 14(1): 330.

Roggia C, Gao Y, Cenci S, Weitzmann MN, Toraldo G, Isaia G, Pacifici R. (2001) Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(24): 13960-13965.

Roodman G, Ibbotson KJ, MacDonald B, Kuehl T, Mundy G. (1985) 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 causes formation of multinucleated cells with several osteoclast characteristics in cultures of primate marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82(23): 8213-8217.

Sachse A, Wagner A, Keller M, Wagner O, Wetzel W-D, Layher F, Venbrocks R-A, Hortschansky P, Pietraszczyk M, Wiederanders B. (2005) Osteointegration of hydroxyapatite-titanium implants coated with nonglycosylated recombinant human bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in aged sheep. *Bone* 37(5): 699-710.

Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. (2001) 17 $\beta$ -Estradiol Stimulates Expression of Osteoprotegerin by a Mouse Stromal Cell Line, ST-2, via Estrogen Receptor- $\alpha$  1. *Endocrinology* 142(6): 2205-2212.

Saito H, Takeda S, Amizuka N. (2013) Eldecalcitol and calcitriol stimulates 'bone minimodeling,' focal bone formation without prior bone resorption, in rat trabecular bone. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 136: 178-182.

Saito M, Shiraishi A, Ito M, Sakai S, Hayakawa N, Mihara M, Marumo K. (2010) Comparison of effects of alfacalcidol and alendronate on mechanical properties and bone collagen cross-links of callus in the fracture repair rat model. *Bone* 46(4): 1170-1179.

Sakai S, Takaishi H, Matsuzaki K, Kaneko H, Furukawa M, Miyauchi Y, Shiraishi A, Saito K, Tanaka A, Taniguchi T. (2009) 1-Alpha, 25-dihydroxy vitamin D3 inhibits osteoclastogenesis through IFN-beta-dependent NFATc1 suppression. *Journal of bone and mineral metabolism* 27(6): 643-652.

Saleh NK, Saleh HA. (2011) Olive oil effectively mitigates ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *BMC complementary and alternative medicine* 11: 10.

Sarma U, Edwards M, Motoyoshi K, Flanagan A. (1998) Inhibition of bone resorption by 17 $\beta$ -estradiol in human bone marrow cultures. *Journal of cellular physiology* 175(1): 99-108.

Scharla S, Schacht E, Bawey S, Kamilli I, Holle D, Lempert U. (2003) Pleiotropic effects of alfacalcidol in elderly patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis+ rheuma* 23: 268-274.

Schett G. (2011) Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. *European journal of clinical investigation* 41(12): 1361-1366.

Scull CM, Hays WD, Fischer TH. (2010) Macrophage pro-inflammatory cytokine secretion is enhanced following interaction with autologous platelets. *Journal of inflammation* 7: 53.

Seebeck J, Goldhahn J, Morlock M, Schneider E. (2005) Mechanical behavior of screws in normal and osteoporotic bone. *Osteoporosis international* 16(2): S107-S111.

Seif AA. (2014) Nigella Sativa reverses osteoporosis in ovariectomized rats. *BMC complementary and alternative medicine* 14: 22.

Sfeir C, Ho L, Doll BA, Azari K, Hollinger JO. (2005) Fracture Repair. In: Lieberman JR and Friedlaender GE (eds). *Bone regeneration and repair*. Humana Press, New York City.

Shayesteh YS, Khorsand A, Motahary P, Dehghan M, Ardestani MS. (2005) Evaluation of Platelet-Rich Plasma in Combination with Deproteinized Bovine Bone Mineral in the Rabbit Cranium; A Pilot Study. *Journal of Dentistry* 2(4): 127-134.

Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW. (2000) Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(14): 7829-7834.

Shibata T, Shira-Ishi A, Sato T, Masaki T, Sasaki A, Masuda Y, Hishiya A, Ishikura N, Higashi S, Uchida Y. (2002) Vitamin D hormone inhibits osteoclastogenesis in vivo by decreasing the pool of osteoclast precursors in bone marrow. *Journal of Bone and Mineral Research* 17(4): 622-629.

Shimizu T, Sasano Y, Nakajo S, Kagayama M, Shimauchi H. (2001) Osteoblastic differentiation of periosteum-derived cells is promoted by the physical contact with the bone matrix in vivo. *The anatomical record* 264(1): 72-81.

Shin Y-H, Cho D-C, Yu S-H, Kim K-T, Cho H-J, Sung J-K. (2012) Histomorphometric analysis of the spine and femur in ovariectomized rats using micro-computed tomographic scan. *Journal of Korean Neurosurgical Society* 52(1): 1-6.

Shiraishi A, Higashi S, Ohkawa H, Kubodera N, Hirasawa T, Ezawa I, Ikeda K, Ogata E. (1999) The advantage of alfacalcidol over vitamin D in the treatment of osteoporosis. *Calcified tissue international* 65(4): 311-316.

Shiraishi A, Takeda S, Masaki T, Higuchi Y, Uchiyama Y, Kubodera N, Sato K, Ikeda K, Nakamura T, Matsumoto T. (2000) Alfacalcidol inhibits bone resorption and stimulates formation in an ovariectomized rat model of osteoporosis: distinct actions from estrogen. *Journal of Bone and Mineral Research* 15(4): 770-779.

Shiraki M, Fukuchi M, Kiriyama T, Okamoto S, Ueno T, Sakamoto H, Nagai T. (2004) Alfacalcidol reduces accelerated bone turnover in elderly women with osteoporosis. *Journal of bone and mineral metabolism* 22(4): 352-359.

Sigrist IM, Gerhardt C, Alini M, Schneider E, Egermann M. (2007) The long-term effects of ovariectomy on bone metabolism in sheep. *Journal of bone and mineral metabolism* 25(1): 28-35.

Simpson E. (2000) Role of aromatase in sex steroid action. *J Mol Endocrinol* 25(2): 149-156.

Simpson E. (2003) Sources of estrogen and their importance. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 86(3): 225-230.

Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Davis S, Jones M. (1999) Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocrine-related cancer* 6(2): 131-137.

Simpson ER, Davis SR. (2001) Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis—some new perspectives. *Endocrinology* 142(11): 4589-4594.

Singh A, Ali S, Mahdi AA, Srivastava RN. (2014) Role of Platelets Rich Plasma in Management of Osteoporotic Fractures. *Annual Research & Review in Biology* 4(8): 1187-1210.

Skripitz R, Aspenberg P. (2001) Early effect of parathyroid hormone (1-34) on implant fixation. *Clinical orthopaedics and related research* 392: 427-432.

Sone T, Fukunaga M, Ono S, Nishiyama T. (1994) A small dose of human parathyroid hormone (1-34) increased bone mass in the lumbar vertebrae in patients with senile osteoporosis. *Mineral and electrolyte metabolism* 21(1-3): 232-235.

Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Pacifici R. (2001) Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *Journal of Biological Chemistry* 276(12): 8836-8840.

Sterck JG, Klein-Nulend J, Lips P, Burger EH. (1998) Response of normal and osteoporotic human bone cells to mechanical stress in vitro. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 274(6): E1113-E1120.

Strømsøe K. (2004) Fracture fixation problems in osteoporosis. *Injury* 35(2): 107-113.

Stuermer E, Sehmisch S, Rack T, Wenda E, Seidlova-Wuttke D, Tezval M, Wuttke W, Frosch K, Stuermer K. (2010) Estrogen and raloxifene improve metaphyseal fracture healing in the early phase of osteoporosis. A new fracture-healing model at the tibia in rat. *Langenbeck's archives of surgery* 395(2): 163-172.

Suda T, Takahashi F, Takahashi N. (2012) Bone effects of vitamin D—Discrepancies between in vivo and in vitro studies. *Archives of biochemistry and biophysics* 523(1): 22-29.

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine reviews* 20(3): 345-357.

Széles L, Keresztes G, Töröcsik D, Balajthy Z, Krenács L, Póliska S, Steinmeyer A, Zuegel U, Pruenster M, Rot A. (2009) 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is an autonomous regulator of the transcriptional changes leading to a tolerogenic dendritic cell phenotype. *The Journal of Immunology* 182(4): 2074-2083.

Takahashi N, Udagawa N, Suda T. (2014) Vitamin D endocrine system and osteoclasts. *BoneKey reports* 3. doi:10.1038/bonekey.2013.229.

Takasu H, Sugita A, Uchiyama Y, Katagiri N, Okazaki M, Ogata E, Ikeda K. (2006) c-Fos protein as a target of anti-osteoclastogenic action of vitamin D, and synthesis of new analogs. *Journal of Clinical Investigation* 116(2): 528-535.

Takeuchi A, Reddy GS, Kobayashi T, Okano T, Park J, Sharma S. (1998) Nuclear factor of activated T cells (NFAT) as a molecular target for 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-mediated effects. *The Journal of Immunology* 160(1): 209-218.

Tang J, Zhou R, Luger D, Zhu W, Silver PB, Grajewski RS, Su S-B, Chan C-C, Adorini L, Caspi RR. (2009) Calcitriol suppresses antiretinal autoimmunity through inhibitory effects on the Th17 effector response. *The Journal of Immunology* 182(8): 4624-4632.

Taranta A, Brama M, Teti A, Scandurra R, Spera G, Agnusdei D, Termine J, Migliaccio S. (2002) The selective estrogen receptor modulator raloxifene regulates osteoclast and osteoblast activity in vitro. *Bone* 30(2): 368-376.

Taylor J. (1992) Delayed union and nonunion of fractures. *Campbell's operative orthopaedics* 28: 1287-1345.

Thompson D, Simmons H, Pirie C, Ke H. (1995) FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 17(4): S125-S133.

Tielinen L, Manninen M, Puolakkainen P, Kellomäki M, Törmälä P, Rich J, Seppälä J, Rokkanen P. (2001) Inability of transforming growth factor- $\beta$ 1, combined with a bioabsorbable polymer paste, to promote healing of bone defects in the rat distal femur. *Archives of orthopaedic and trauma surgery* 121(4): 191-196.

Tilyard MW, Spears GF, Thomson J, Dovey S. (1992) Treatment of postmenopausal osteoporosis with calcitriol or calcium. *New England Journal of Medicine* 326(6): 357-362.

Tucker G, Gagnon RE, Haussler MR. (1973) Vitamin D 3-25-hydroxylase: tissue occurrence and apparent lack of regulation. *Archives of biochemistry and biophysics* 155(1): 47-57.

Turner CH, Roeder RK, Wiczorek A, Foroud T, Liu G, Peacock M. (2001) Variability in skeletal mass, structure, and biomechanical properties among inbred strains of rats. *Journal of Bone and Mineral Research* 16(8): 1532-1539.

Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. (1994) Skeletal Effects of Estrogen\*. *Endocrine reviews* 15(3): 275-300.

Väänänen HK, Härkönen PL. (1996) Estrogen and bone metabolism. *Maturitas* 23: S65-S69.

van de Watering FC, Molkenboer-Kuenen JD, Boerman OC, van den Beucken JJ, Jansen JA. (2012) Differential loading methods for BMP-2 within injectable calcium phosphate cement. *Journal of Controlled Release* 164(3): 283-290.

Veldman CM, Cantorna MT, DeLuca HF. (2000) Expression of 1, 25-dihydroxyvitamin D 3 receptor in the immune system. *Archives of biochemistry and biophysics* 374(2): 334-338.

Verstuyf A, Segaert S, Verlinden L, Bouillon R, Mathieu C. (2000) Recent developments in the use of vitamin D analogues. *Expert opinion on investigational drugs* 9(3): 443-455.

Wang J, Li W, Xu S, Yang D, Wang Y, Lin M, Zhao G. (2005) Osteoporosis influences the middle and late periods of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Chinese journal of traumatology= Zhonghua chuang shang za zhi/Chinese Medical Association* 8(2): 111-116.

Watkins MP, Norris JY, Grimston SK, Zhang X, Phipps RJ, Ebetino FH, Civitelli R. (2012) Bisphosphonates improve trabecular bone mass and normalize cortical thickness in ovariectomized, osteoblast connexin43 deficient mice. *Bone* 51(4): 787-794.

Weinstein RS, Underwood JL, Hutson MS, DeLuca HF. (1984) Bone histomorphometry in vitamin D-deficient rats infused with calcium and phosphorus. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 246(6): E499-E505.

Weisman Y, Harell A, Edelstein S, David M, Spierer Z, Golander AI. (1979) 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D3, and 24, 25-dihydroxyvitamin D3 in vitro synthesis by human decidua and placenta. *Nature* 281(5729): 317-319.

Wiltfang J, Kloss FR, Kessler P, Nkenke E, Schultze-mosgau S, Zimmermann R, Schlegel KA. (2004) Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. *Clinical oral implants research* 15(2): 187-193.

Wronski T, Cintron M, Dann L. (1988) Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcified tissue international* 43(3): 179-183.

Wronski T, Dann L, Horner S. (1989) Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 10(4): 295-301.

Wu CC, Wang CC, Lu DH, Hsu LH, Yang KC, Lin FH. (2012) Calcium phosphate cement delivering zoledronate decreases bone turnover rate and restores bone architecture in ovariectomized rats. *Biomedical Materials* 7(3): 035009.

Xiong L, Zeng J, Yao A, Tu Q, Li J, Yan L, Tang Z. (2015) BMP2-loaded hollow hydroxyapatite microspheres exhibit enhanced osteoinduction and osteogenicity in large bone defects. *International Journal of Nanomedicine* 10: 517-526.

Xu S, Yu R, Zhao G, Wang J. (2003) Early period of fracture healing in ovariectomized rats. *Chinese journal of traumatology= Zhonghua chuang shang za zhi/Chinese Medical Association* 6(3): 160-166.

Xue D, Li F, Chen G, Yan S, Pan Z. (2014) Do bisphosphonates affect bone healing? A meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of orthopaedic surgery and research* 9: 45.

Yang X, Ricciardi BF, Hernandez-Soria A, Shi Y, Camacho NP, Bostrom MP. (2007) Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone* 41(6): 928-936.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S-i, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A. (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(7): 3597-3602.

Yu X, Wang L, Jiang X, Rowe D, Wei M. (2012) Biomimetic CaP coating incorporated with parathyroid hormone improves the osseointegration of titanium implant. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 23(9): 2177-2186.

Yu Y, Gifford K, Low A, Walsh W. (2002) BIOMOLECULAR FACTORS IN FRACTURE HEALING OF OSTEOPOROTIC RAT BONES. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume* 84(SUPP III): 282-282.

Zehnder D, Bland R, Williams MC, McNinch RW, Howie AJ, Stewart PM, Hewison M. (2001) Extrarenal Expression of 25-Hydroxyvitamin D3-1 $\alpha$ -Hydroxylase 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86(2): 888-894.

Zhang Y, Lai W-P, Leung P-C, Wu C-F, Wong M-S. (2007) Short-to mid-term effects of ovariectomy on bone turnover, bone mass and bone strength in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30(5): 898-903.

Zhang Y, Leung DY, Richers BN, Liu Y, Remigio LK, Riches DW, Goleva E. (2012) Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *The Journal of Immunology* 188(5): 2127-2135.

Zhao H, Tian Z, Cheng L, Chen B. (2004) Electroacupuncture enhances extragonadal aromatization in ovariectomized rats. *Reproductive biology and endocrinology* 2(18): 225.

Zhao H, Tian Z, Hao J, Chen B. (2005) Extragonadal aromatization increases with time after ovariectomy in rats. *Reprod Biol Endocrinol* 3(6): i0006-3363.

Zupan J, Jeras M, Marc J. (2013) Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. *Biochemia medica* 23(1): 43-63.



---

## Биографија аутора

Јелена Рајковић рођена је 23.09.1982. године у Нишу, где је завршила основну и средњу школу.

Школске 2001/02. године уписала је студије на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу, на Одсеку за биологију и екологију. У току студија била је стипендиста Фонда за талентоване ученике и студенте града Ниша. Дипломирала је 27.12.2007. године дипломским радом под називом "*In vitro* вијабиност ћелија костне сржи и перитонеалног испирка миша *Balb/c* у функцији температуре и времена стајања", са оценом 10 и просечном оценом 9,56 у току студија. Уписала је докторске академске студије из области "Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија" на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу, Институт за биологију и екологију, 2008. године.

Јелена Рајковић је 2008. године засновала радни однос у Лабораторији за електронску микроскопију Института за Биомедицинска истраживања на Медицинском факултету у Нишу као стручни сарадник у области електронске микроскопије и експерименталне патологије.

Фебруара 2009. године запослена је као сарадник у настави за ужу научну област Биотехнологија на Одсеку за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Нишу. Била је ангажована у извођењу практичне наставе на предметима Биохемија, Упоредна физиологија животиња и Имунобиологија. У звање асистента изабрана је 2011. године за исту научну област. Као асистент била је ангажована у извођењу практичне наставе из предмета: Биохемија, Физиологија животиња, Имунобиологија (Основне академске студије Биологије), Упоредна физиологија животиња (Дипломске академске студије Биологије).

Новембра 2012. године похађала је програм континуиране едукације КМЕ 119 „Принципи рада са експерименталним животињама у биомедицинским истраживањима” на Медицинском факултету у Нишу.

Од стране Етичког комитета Медицинског факултета у Нишу добила је дозволу за експериментални рад на животињама (број 01-6481-18).

Јелена Рајковић учествује у реализацији научно-истраживачких пројеката који су финансирани од стране Министарства просвете и науке Републике Србије под називом: „Виртуелни коштаноглобни систем човека и његова примена у претклиничкој и клиничкој пракси“ (ИИИ41017), у оквиру кога је изабрала тему за израду своје докторке дисертације, и „Примена функционализованих угљеничних нанопроводника и наночестица злата за припрему дендритских ћелија у терапији тумора“ (175102).

До сада је објавила 35 библиографских јединица: 9 радова у међународним часописима, 1 рад у часопису националног значаја, 23 конгресних саопштења на скуповима међународног значаја и 2 конгресна саопштења на скуповима националног значаја.

---

## БИБЛИОГРАФИЈА

### Радови објављени у врхунским међународним часописима – кат. М21:

1. Tomić S, Dokić J, Vasilijić S, Ogrinc N, Rudolf R, Pelicon P, Vučević D, Milosavljević P, Janković S, Anžel I, **Rajković J**, Rupnik MS, Friedrich B, Colić M. Size-Dependent Effects of Gold Nanoparticles Uptake on Maturation and Antitumor Functions of Human Dendritic Cells In Vitro. PLoS One 2014; 9(5): e96584.
2. Colic M, Dzopalic T, Tomic S, **Rajkovic J**, Rudolf R, Vukovic G, Marinkovic A, Uskokovic P. Immunomodulatory effects of carbon nanotubes functionalized with a Toll-like receptor 7 agonist on human dendritic cells. Carbon 2014; 67: 273-287.

### Радови објављени у истакнутим међународним часописима – кат. М22:

1. Mihajilov-Krstev T, Jovanović B, Jović J, Ilić B, Miladinović D, Matejić J, **Rajković J**, Đorđević LJ, Cvetković V, Zlatković B. Antimicrobial, Antioxidative, and Insect Repellent Effects of *Artemisia absinthium* Essential Oil. Planta Med 2014; 80(18): 1698-1705.
2. Stojanović-Radić Z, ČomićLj, Radulović N, Blagojević P, Denić M, Miltojević A, **Rajković J**, Mihajilov-Krstev T. Antistaphylococcal activity of *Inula helenium* L. root essential oil: eudesmane sesquiterpene lactones induce cell membrane damage. EUR J CLIN MICROBIOL 2012; 31(6): 1015-1025.

### Радови објављени у научним часописима међународног значаја– кат. М23:

1. **Rajković J**, Stojanović S, ĐorđevićLj, Cvetković T, and Najman S. Locally applied cholecalciferol and alfacalcidol act differently on healing of femur defects filled with bone mineral matrix and platelet-rich plasma in ovariectomized rats. Biotechnology & Biotechnological Equipment 2015; doi: 10.1080/13102818.2015.1055702
2. Kostić M, **Rajković J**, Potić Floranović M, Dimov I, Pavlović D. Multiple sclerosis and oxidative stress - a clinical perspective. NEUROCHEM J+ 2013; 7(1):76-86.
3. Cvetković V, Najman S, **Rajković J**, Zabar A, Vasiljević P, Đordjević LJ, Trajanović M. A comparison of the microarchitecture of lower limb long bones between some animal models and humans: a review. VET MED 2013; 58(7): 339-351.
4. Stojanović-Radić Z, Čomić Lj, Radulović N, Blagojević P, Mihajilov-KrstevT, **Rajković J**. Commercial Carlinae radix herbal drug: Botanical identity, chemical composition and antimicrobial properties. PHARM BIOL 2012; 50(8): 933-940.
5. Kostić M, Krunić N, Nikolić LJ, Nikolić V, Najman S, Kostić I, **Rajković J**, Manić M, Petković D. Influence of Residual Monomer Reduction on Acrylic Denture Base Resins Quality. HEM IND 2011; 65 (2): 171-177.

---

**Радови објављени у научним часописима – кат. М53:**

1. Žabar A, Cvetković V, **Rajković J**, Jović J, Vasiljević P, Mitrović T. Larvicidal activity and in vitro effects of green tea (*Camellia sinensis* L.) water infusion. *Biologica Nyssana* 2013; 4 (1-2): 75-79.

**Саопштења са међународних скупова штампана у целини – кат. М33:**

1. Nikola Korunović, **Jelena Rajković**, Slađana Petrović, Stevo Najman, Dragan Mihailović. Application of Computed Tomography in Diagnostics and Management of Osteoporosis. 6<sup>th</sup> International ICT Conference, Nish, Serbia, October 14-16, 2014, pp 141-146.

**Саопштења са међународних скупова штампана у изводу – кат. М34:**

1. Ajduković Z, Ignjatović N, Petrović N, **Rajković J**, Kenić-Marinković D, Najman S, Mihailović D, Uskoković D. Interaction of nanoparticles and biological fluids. The Sixteenth Annual Conference YUCOMAT 2014, Herceg Novi, September 1-5, 2014, Programme and The Book of Abstracts, p 113.
2. Cvetković V, Najdanović J, Vukelić-Nikolić M, Stanisavljević M, **Rajković J**, Živković J, Stojanović S, Najman S. Gene Expression Pattern of Some Bone-related Markers in *In vitro* Osteoinduced Adipose-derived Stem Cells Isolated from Balb/c Mice. V Congress of the Serbian Genetic Society, Kladovo, Serbia, September 28 – October 2, 2014., Book of Abstracts p 105.
3. Cvetković V, Najman S, Najdanovic J, Stanisavljević M, Vukelić-Nikolić M, Stojanovic S, **Rajković J**. Histochemical Analysis of *In vivo* Osteogenic Processes in Constructs Consisted of Adipose-Derived Stem Cells, Platelet-rich Plasma and Bone Mineral Matrix. The 33th Balkan Medical Week, Bucharest, Romania, 2014, Archives of the Balkan Medical Union, Supplement I, A93.
4. Stojanović S, Najman S, Miljković M, Mitić Ž, **Rajković J**, Trajanović M. Analysis of the Surface of Bio-Oss® Particles after Incubation in Cell Culture Medium using Scanning Electron Microscopy. The Serbian Ceramic Society Conference »Advanced Ceramics and Application III«, Belgrade, Serbia, September 29 – October 1, 2014, Programme and The book of abstract, p 127.
5. Ajduković Z, Petrović N, Ignjatović N, Mihajilov-Krstev T, **Rajković J**, Kenic-Marinković D, Uskoković D. Hemolytic, antimicrobial and histological analysis of nanocomposite biomaterials based on HAp and polymers Thirteenth Young Researchers' Conference - Materials Science and Engineering, Belgrade, Serbia, December 10-12, 2014, Programme and The Book of Abstracts, p 5.
6. **Rajković J**, Najman S, Stojanović S, Đorđević Lj, Cvetković V, Ajduković Z. Early Fracture Healing in Ovariectomized Rats Femur Helped With Alfacalcidol and Platelet-Rich Plasma on Bio-oss Carrier. Thirteenth Young Researchers' Conference - Materials

---

Science and Engineering, Belgrade, Serbia, December 10-12, 2014, Programme and The Book of Abstracts, p 8.

7. Aleksić M, Žabar A, **Rajković J**, Vasiljević P, Đorđević LJ, Mitić Ž, Najman S. Comparison of biocompatibility of three materials based on porous apatite. The Fifteenth Annual Conference YUCOMAT 2013, Herceg Novi, September 2-6, 2013, Programme and the book of Abstracts, p 139.
8. Ajduković Z, Ignjatović N, Petrović N, **Rajković J**, Kenić-Marinković D, Najman S, Uskoković D. Nanoparticles Ca/Co-HAp in the treatment of weakened bones jaw tegmenta. The Fifteenth Annual Conference YUCOMAT 2013, Herceg Novi, September 2-6, 2013, Programme and the book of Abstracts, p 147.
9. **Rajković J**, Šorgić D, Đorđević LJ, Joković N, Ilić B, Miladinović D, Stojanović N, Mihajilov-Krstev T. Acute oral toxicity of *Artemisia absinthium* essential oil on female BALB/c mice. 11<sup>th</sup>Symposium of the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Vlasina Lake, September 13-16, 2013, Book of abstracts, p 76-77.
10. **Rajković J**, Cvetković T, Najman S, Boričić M, Ajduković Z, Krstić V, Trajanović M. Biochemical parameters and CT scanner analysis as indicators of experimental model of postmenopausal osteoporosis induced by ovariectomy. 11<sup>th</sup>Symposium of the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Vlasina Lake, September 13-16, 2013, Book of abstracts, p 77-78.
11. Aleksić M, **Rajković J**, Vasiljević P, Đorđević Lj, Miljković M, Najman S, Jokanović V. Biocompatibility screening of biomaterial based on porous apatite with a film of alginate polymer. Serbian Ceramic Society Conference. Advanced ceramics and application II, Belgrade, Serbia, September 30 – October 1, 2013, Program and the Book of Abstracts p 53.
12. Žabar A, Cvetković V, **Rajković J**, Jović J, Vasiljević P, Mitrović T. The *in vivo* and *in vitro* effects of different concentrations of green tea (*Camellia sinensis*) infusion. Abstract book of the Belgrade Food International conference “Food, health and well being”, Belgrade, Serbia, November 26-28, 2012, p 80.
13. Ajduković Z, Ignjatović N, Petrović N, Najman S, **Rajković**, Kenić-Marinković D, Krstić V, Uskoković D. Hemolytic activity of bioactive nanocomposites. Joint Event of the 11th Young Researchers’ Conference: Materials Science and Engineering and the 1st European Early Stage Researches’ Conference on Hydrogen Storage, December 3-5, 2012, Program and the Book of Abstracts, p 49.
14. Ajduković Z, Ignjatović N, **Rajković J**, Najman S, Mihailović D, Petrović N, Kenić-Marinković D, Uskoković D. Bioactive composite materials in regeneration of the resorbed bone of alveolar ridges. Joint Event of the 11th Young Researchers’ Conference: Materials Science and Engineering and the 1st European Early Stage Researches’ Conference on Hydrogen Storage, December 3-5, 2012, p 103.
15. Ajduković Z, Ignjatović N, Savić V, Najman S, Mihailović D, **Rajković J**, Petrović N,

---

Uskoković D. Hydroxyapatite and hydroxyapatite substituents in strengthening of the jaw bone tegmenta. The Fourteenth Annual Conference YUCOMAT 2012, Herceg Novi, September 3-7, 2012, Programme and the Book of Abstracts, p 121.

16. Ajdukovic Z, **Rajkovic J**, Savic V, Najman S, Ignjatovic N, Uskokovic D. Application of nanoparticles Ca/Co-Hap in reparation of alveolar bone. 1st Conference of the Serbian Ceramic Society 1CSCS-2011, Belgrade, Serbia, March 17-18, 2011, Program and the Book of Abstracts, p 73.
17. **Rajković J**, Stojanović S, Najman S, Kostić M, Savić V. Propolis effect on morphology of human gingival fibroblasts *in vitro*. 10th Multinational Congress on Microscopy. Scientific Campus, Urbino University “Carlo Bo”, Italy, September 4-9, 2011, Proceedings, p 221-222.
18. Jušković M, Vasiljević P, **Rajković J**, Stevanović B, Stevanović V. Morfološke karakteristike epidermisa lista balkanske endemične vrste *Daphne malyana* Blečić (Thymeleaceae). 10. Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih područja. Vlasinsko jezero, 17–20 jun 2010, Knjiga apstrakta, str. 52-53.
19. Vasiljević P, Najman S, **Rajković J**, Ajduković Z, Savić V, Ignjatović N, Uskoković D. *In vitro* interaction between bone marrow cells and nanomaterials CoHAp. Twelfth Annual Conference YUCOMAT 2010, Herceg Novi, Montenegro, September 6-10, 2010, Programme and The Book of Abstracts, p 166.
20. Najman S, **Rajković J**, Kostić M, Krunić N, Savić V. SEM analysis of the surface structure of acrylic prosthetic materials after immersion in artificial saliva. Četvrti srpski kongres za mikroskopiju, 11–12 Oktobar 2010, Beograd, Srbija, Knjiga prosirenih apstrakata, str. 65-66.
21. **Rajković J**, Potić M, Kostić M, Mitić B, Djordjević V, Savić V. Value Of Electron Microscopy In Living Donor Transplantation In The Case Of Alport Syndrome. Četvrti srpski kongres za mikroskopiju, 11-12 Oktobar 2010, Beograd, Srbija, Knjiga prosirenih apstrakata, str. 149-150.
22. **Rajković J**, Dimov I, Čolić M, Savić V. SEM Characteristics of dendritic and mesangial cells in culture. Microscopy Conference, Graz, Austria, August 30 – September 4, 2009, Life Sciences, Volume 2, p 257-258.

---

**Саопштења са националних скупова штампана у целости – кат. М63:**

1. Potić M, **Rajković J**, Kostić M, Mitić B, Đorđević V, Savić V, Bogoslović M. Uloga elektronske mikroskopije u dijagnostici Alportovog sindroma – prikaz slučaja. Timočki medicinski glasnik 2011; 36(3):162-165.

**Саопштења са националних скупова штампана у изводу – кат. М64:**

1. Nebojša Krunic, Milena Kostić, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, Stevo Najman, **Jelena Rajković**. Reduction of potential denture base resins toxicity. Book of Abstracts. 9th symposium „Novel technologies and economic development“, Leskovac, October 21-22, 2011, Book of abstracts, p 119.

## ARTICLE; MEDICAL BIOTECHNOLOGY

### Locally applied cholecalciferol and alfacalcidol act differently on healing of femur defects filled with bone mineral matrix and platelet-rich plasma in ovariectomized rats

Jelena Rajković<sup>a</sup>, Sanja Stojanović<sup>b,c</sup>, Ljubiša Đorđević<sup>a</sup>, Tatjana Cvetković<sup>d</sup> and Stevo Najman<sup>b,c\*</sup>

<sup>a</sup>Faculty of Science and Mathematics, Department of Biology and Ecology, University of Niš, Niš, Serbia; <sup>b</sup>Faculty of Medicine, Department of Biology and Human Genetics, University of Niš, Niš, Serbia; <sup>c</sup>Faculty of Medicine, Department for Cell and Tissue Engineering, University of Niš, Niš, Serbia; <sup>d</sup>Faculty of Medicine, Institute of Biochemistry, University of Niš, Niš, Serbia

(Received 31 March 2015; accepted 25 May 2015)

Vitamin D and its analogues that are often used in the treatment of osteoporosis have also been shown to affect the healing of bone fractures. To avoid the high-dose systemic treatments, needed to achieve faster healing of fractured bone, the approach of local application of these drugs has become very attractive. The aim of our study was to examine the influence of cholecalciferol and alfacalcidol, locally applied with bovine bone mineral matrix (Bio-Oss), supplemented with platelet-rich plasma on femur defect healing in ovariectomized rats. Experimental osteoporosis was induced by bilateral ovariectomy. To estimate the healing of defects, the formation of the new bone tissue and the resorption of Bio-Oss particles after two and eight weeks of defect healing, we performed biochemical, histological, immunohistochemical, histomorphometric and scanning electron microscopy analyses. Our results showed that locally applied cholecalciferol and alfacalcidol delay early bone healing of defect in ovariectomized rat model. Both of the examined vitamins, particularly alfacalcidol, decreased the resorption of Bio-Oss particles in defects. Only alfacalcidol affected the formation of histologically normal new bone tissue with a good integration into the surrounding osteoporotic bone. Cholecalciferol allowed callus mineralization and led to the formation of new bone with high quantity, with characteristics, similar to those of the control group. Our results suggested that alfacalcidol and cholecalciferol may be promising tools for the local treatment of osteoporotic fractures, but the goal of application should specify the choice of vitamin D form, as well as the composition of scaffolds, with which they are applied.

**Keywords:** alfacalcidol; cholecalciferol; bone defect healing; ovariectomy; osteoporosis; rat

#### Introduction

Osteoporosis, a disease characterized by reduced bone mineral density (BMD), strength and quality, is a great problem in stomatology and orthopaedics, because of the bone loss and the reduced capacity of the osteoporotic bone to provide the necessary support for an implant. The major threats for patients, suffering from osteoporosis, are fractures that are very difficult to heal in osteoporotic conditions. Therefore, it is favourable to use drugs and bone substitutes that will improve the bone formation and strengthen the site of the fracture.

Local drug delivery has become an attractive approach in recent years, because, in this way, it is possible to avoid the side effects of the high-dose systemic treatments, needed to achieve faster healing of the fractured bone.[1] Vitamin D, often used in the treatment of osteoporosis, has been shown to improve the healing of fractures in non-osteoporotic,[2,3] as well as in ovariectomized rats model,[4,5] when applied orally. Anyway, its local application, in combination with bone substitutes, is poorly investigated in osteoporotic bone repair. It has been shown that cholecalciferol exerts positive impact on

osteogenesis and callus characteristics when delivered locally with hydroxyapatite (HAp) nanoparticles.[6] Local effect of vitamin D precursors seems possible, due to their local conversion to the active metabolite 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in osteoblasts.[7,8] Biomaterials based on HAp are often used as bone substitutes alone, or as a component of implants, showing among other properties a high capacity to absorb vitamin D.[9] In regenerative medicine, supplementation with platelet-rich plasma (PRP) enhances the osteoinductivity of bone substitute biomaterials and improves bone regeneration.[10] It is also known that co-treatment with PRP and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> stimulate osteogenic differentiation *in vitro*.[11]

The aim of our study was to examine the influence of cholecalciferol and alfacalcidol, locally applied in combination with bovine bone mineral matrix, supplemented with PRP, on femur defect healing in ovariectomized rats. Additionally, we examined the influence of these two vitamin D forms on the characteristics of the new bone tissue formed under the osteoporotic conditions. These are our preliminary results of a wider study that is still in progress.

\*Corresponding author. Email: [stevo@medfak.ni.ac.rs](mailto:stevo@medfak.ni.ac.rs)

# БИБЛИОТЕЧКА ДОКУМЕНТАЦИЈА



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ  
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ



Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија

## КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈА

<b>Редни број</b>	
<b>Тип записа</b>	Текстуални штампани материјал
<b>Врста рада</b>	Докторска дисертација
<b>Аутор</b>	Јелена Рајковић
<b>Ментор</b>	проф. др Стево Најман
<b>Наслов рада</b>	Упоредна анализа ефеката холекалциферола и алфакалцидола као саставних делова имплантата на процес зарастања дефеката у фемуру оваријектомисаних пацова
<b>Језик публикације</b>	Српски (ћирилица)
<b>Језик извода</b>	Српски
<b>Земља публикавања</b>	Србија
<b>Година публикације</b>	2015.
<b>Издавач</b>	Ауторски репринт
<b>Место и адреса</b>	Радоја Домановића 12 34000 Крагујевац, Србија
<b>Научна област</b>	Биологија
<b>Научна дисциплина</b>	Физиологија животиња
<b>Предметна одредница/кључне речи</b>	оваријектомија, остеопороза, витамин Д, холекалциферол, алфакалцидол, дефект, фемур
<b>Чува се</b>	У библиотеци Природно-математичког факултета у Крагујевцу, Р. Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија
<b>Важна напомена</b>	
<b>Извод</b>	
<p>Постменопаузна остеопороза је системска скелетна болест која се карактерише смањеном коштаном масом и нарушеном микроархитектуром кости које су последица недостатка естрогена. Смањена синтеза естрогена у менопаузи доводи до нарушеног баланса између разградње и изградње кости, услед чега долази до губитка коштаног ткива у појединим</p>	



деловима скелета и настанка фрактура. Остеопороза представља велики проблем у стоматологији и ортопедији због смањеног капацитета остеопоротичне кости да обезбеди неопходну потпору имплантатима и омогући адекватну фиксацију прелома.

Зарастање фрактура у остеопоротичним условима је отежано због чега је пожељно коришћење лекова и коштаних заменика који би унапредили регенерацију кости и ојачали преломљено место. Показано је да витамин Д и његови аналози, који се користе у превенцији и третману остеопорозе, повољно утичу на зарастање прелома. Међутим, високе дозе овог витамина које су неопходне за остваривање директних анаболичких ефеката на кост, доводе до појаве хиперкалцемије. Како би се избегли нежељени ефекти системске администрације високих доза витамина Д, једна од могућности је њихова локална примена у место дефекта.

Главни циљ докторске дисертације је испитивање утицаја локално примењених холекалциферола и алфакалцидола, као саставних делова имплантата сачињених од минералног матрикса кости (ММК) и плазме обогаћене тромбоцитима (PRP), на процес зарастања дефеката у остеопоротичној кости пацова. Упоредни преглед остеогених ефеката холекалциферола и алфакалцидола, као и поређење добијених резултата са спонтаном регенерацијом остеопоротичне кости и регенерацијом уз помоћ имплантата састављених само од минералног матрикса кости и PRP, су такође анализирани у оквиру дисертације. С тим у вези, циљ дисертације је и успостављање и верификовање експерименталног модела остеопорозе изазване овариектомијом женки пацова Wistar соја који би био погодан за овакву врсту истраживања.

Према постављеним циљевима истраживања урађене су две експерименталне студије. У првој студији експериментална остеопороза је изазвана билатералном овариектомијом и време које је потребно за развој остеопоротичних знакова и настанак промена у феморалној кости је процењивано ендокринолошким, биохемијским и радиолошким методама. У оквиру друге експерименталне студије, након добијања модела остеопорозе код пацова, креирани су дефекти до костне сржи у дисталном делу оба фемура. Дефекти су остављени да спонтано зарастају (CP група) или су испуњавани имплантатима сачињеним од минералног матрикса кости и PRP, који су примењени сами (СЦ група), или у комбинацији са испитиваним формама витамина Д, холекалциферолом (ХЦ група) и алфакалцидолом (АЦ група). Минерални матрикс кости се иначе користи као коштани заменик и скафолд за насељавање ћелија, а у овим испитивањима је служио и као носач за PRP и испитиване форме витамина Д. За праћење регенерације остеопоротичне кости коришћене су биохемијске, хистолошке, имунохистохемијске, хистоморфометријске и скенинг-електрономикроскопске методе и анализирани су периоди две недеље и осам недеља од креирања дефеката у фемуру пацова.

Резултати прве студије показују да је до значајног опадања концентрације естрадиола, након његових почетних флукуација, дошло у трећем месецу након овариектомије пацова Wistar соја. Активности ензима ALP и AP су повишене током испитиваног периода у групи овариектомисаних пацова, док је концентрација Са у серуму нижа у четвртном, а концентрација Р у другом месецу након овариектомије у односу на пацове из контролне групе. Радиолошка анализа је показала смањење коштане густине у дисталном делу фемура након три месеца од овариектомије.

Резултати друге студије показују да локално примењени холекалциферол и алфакалцидол, у коришћеном експерименталном дизајну и примењеној дози, одлажу рани процес зарастања кости и спречавају настанак фиброзе код овариектомисаног модела пацова. Обе испитиване форме витамина Д смањују ресорпцију партикула ММК у месту дефекта, што представља сметњу за формирање нове кости у групи третираној алфакалцидолом. Алфакалцидол доводи до настанка слабо минерализованог калуса који се карактерише интензивном балансираном ремоделацијом, компактношћу и добром интеграцијом у околну

остеопоротичну кост. Под утицајем холекалциферола развија се велика количина калуса који се одликује добром минерализацијом, али такође и порозношћу и слабом интеграцијом, што су карактеристике калуса сличне оним у групи са спонтаном регенерацијом.

Холекалциферол и алфакалцидол су показали бројне ефекте у коришћеном експерименталном дизајну на основу којих се може сугерисати њихова примена као потенцијалних агенаса у решавању различитих проблема у регенерацији остеопоротичне кости. Избор одговарајуће форме витамина Д, као и биоматеријала који би био коришћен као имплантат за попуњавање дефеката у кости, треба бити направљен у складу са циљем третмана. Резултати ове докторске дисертације су допринос бољем разумевању механизма деловања алфакалцидола и холекалциферола на регенерацију остеопоротичне кости, са практичном применом у отварању нових терапеутских приступа лечењу дефеката кости у остеопоротичним условима.

<b>Датум прихватања теме од стране ННВ</b>	27.08.2014.
<b>Датум одбране</b>	
<b>Чланови комисије</b>	<hr/> <p>Др Стево Ј. Најман, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу;</p> <hr/> <p>Др Андраш Ш. Штајн, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу;</p> <hr/> <p>Др Бранка И. Огњановић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу;</p> <hr/> <p>Др Љубиша Б. Ђорђевић, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу.</p>



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ



ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ

Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија

KEY WORDS DOKUMENTATION

<b>Accession number</b>	
<b>Type of record</b>	Textual material, printed
<b>Contents code</b>	PhD thesis
<b>Author</b>	Jelena Rajković
<b>Mentor</b>	Prof. dr Stevo Najman
<b>Title</b>	Comparative analysis of the effects of cholecalciferol and alfacalcidol as integral parts of the implants on the healing of femur defects in ovariectomized rats
<b>Language of text</b>	Serbian (Cyrillic)
<b>Language of abstract</b>	Serbian / English
<b>Country of publication</b>	Serbia
<b>Publication year</b>	2015.
<b>Publisher</b>	Copyright reprint
<b>Publisher place</b>	Radoja Domanovića 12 34000 Kragujevac, Serbia
<b>Scientific field</b>	Biology
<b>Scientific discipline</b>	Animal physiology
<b>Key words</b>	ovariectomy, osteoporosis, vitamin D, cholecalciferol, alfacalcidol, defect, femur
<b>Holding data</b>	In library of Faculty of Science, Kragujevac 34000 Kragujevac, Serbia, R. Domanovića 12
<b>Note</b>	

**Abstract**

Postmenopausal osteoporosis is a systemic skeletal disease caused by lack of estrogen and characterized by low bone mass and impaired microarchitecture. Reduced synthesis of estrogen in menopause leads to impaired balance between bone resorption and bone formation, causing a loss of bone tissue in some parts of the skeleton and susceptibility to fractures. Osteoporosis is a major problem in dentistry and orthopedics due to reduced capacity of osteoporotic bone to provide the necessary support to implants and enable adequate fracture fixation.

Osteoporotic fractures are very difficult to heal in osteoporotic conditions, therefore, it is favourable to use drugs and bone substitutes that will improve the bone regeneration and strengthen the site of the fracture. It has been shown that vitamin D and its analogues, which are widely used in

the treatment of osteoporosis, have a positive effect on the healing of fractures. However, high doses of vitamin D, which are necessary for obtaining the direct anabolic effects on bone, lead to the appearance of hypercalcemia. To avoid side effects of systemic administration of high vitamin D doses, one of the possibilities is their local application into the site of defect.

The main objective of this PhD thesis is to examine the impact of cholecalciferol and alfacalcidol, as integral parts of the implants consisting of bone mineral matrix (BMM) supplemented with platelet-rich plasma (PRP), on femur defect healing in osteoporotic rat bone. Comparative overview of osteogenic effect of cholecalciferol and alfacalcidol as well as comparison of results with the spontaneous regeneration of osteoporotic bone and regeneration with the help of implants composed only of BMM and PRP, were also analyzed in the dissertation. In this regard, the aim of the dissertation is to establish and verify an experimental model of osteoporosis in Wistar rats that is suitable for this type of research.

According to the objectives of the research, two experimental studies were conducted. In the first study, experimental osteoporosis was induced by bilateral ovariectomy and the time required for development of osteoporotic conditions and the occurrence of changes in femoral bone was evaluated by using endocrinological, biochemical and radiological analysis. In the second experimental study, after obtaining osteoporotic rat model, defects were created up to the bone marrow in the distal part of the both femoral diaphysis. The defects were left to heal spontaneously (SR group) or filled with implants composed of bone mineral matrix supplemented with PRP, applied alone (SC group), or as carriers for the examined forms of vitamin D, cholecalciferol (HC group) and alfacalcidol (AC group). Bone mineral matrix serves as a bone substitute and a scaffold for cell colonization, and in these studies it has also served as a carrier for the PRP and tested forms of vitamin D.

Healing of defects and the quality of the newly formed bone tissue were observed by biochemical, histological, immunohistochemical, histomorphometric and scanning electron microscopy analyses. Regeneration process was monitored two and eight weeks after the creation of defects in the femurs of rats.

Results of the first study show that a significant decline in estradiol concentration, after its initial fluctuations, occurred in the third month after ovariectomy. The ALP and AP activity in serum were increased during the examined period, while the concentration of Ca was lower in the fourth and the concentration of P in the second month after ovariectomy compared to control rats. Radiographic analysis showed decrease in bone density in the distal part of the femur, three months after ovariectomy.

Results of the second study show that locally applied cholecalciferol and alfacalcidol, in the used experimental design and applied doses, delay early bone healing and prevent fibrosis in ovariectomized rat model. Both of the examined vitamins decreased the resorption of BMM particles in defects which is a barrier to the formation of new bone in the group treated with alfacalcidol. Alfacalcidol leads to the formation of poorly mineralized callus which is characterized by intense balanced remodeling, compactness and good integration with the surrounding osteoporotic bone. A large amount of callus develops under the influence of cholecalciferol and it is characterized by good mineralization, but also porosity and weak integration, which are characteristics of callus similar to those in the group with spontaneous regeneration.

Cholecalciferol and alfacalcidol showed many effects in the used experimental design on the basis of which their use as potential agents in solving various problems related to the osteoporotic bones regeneration can be assessed. The choice of the appropriate form of vitamin D, as well as biomaterials that would be used as an implant to fill bone defects, should be made in accordance with the objective of treatment.

The results of this PhD thesis contribute to a better understanding of the mechanisms of alfacalcidol and cholecalciferol actions in osteoporotic bone regeneration, with practical application in opening new therapeutic approach to the treatment of bone defects in osteoporotic conditions.

<b>Accepted by Scientific Board on</b>	27.08.2014.
<b>Defended on</b>	
<b>Commission</b>	<p><b>Dr Stevo J. Najman</b>, Full Professor, Faculty of Medicine, University of Niš, Serbia;</p> <p><b>Dr Andraš Š. Štajn</b>, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Kragujevac, Serbia;</p> <p><b>Dr Branka I. Ognjanović</b>, Associate Professor, Faculty of Sciences, University of Kragujevac, Serbia;</p> <p><b>Dr Ljubiša B. Đorđević</b>, Assistant professor, Faculty of Sciences and mathematics, University of Niš, Serbia.</p>

**ОБРАЗАЦ 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписани-а Јелена Рајковић  
број уписа 34/07

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

Упоредна анализа ефеката холекалциферола и алфакалцидола као саставних делова имплантата на процес зарастања дефеката у фемуру оваријектомисаних пацова

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

**Потпис аутора**

У Крагујевцу, 18.08.2015

Јелена Рајковић

**ОБРАЗАЦ 2.**

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

Име и презиме аутора Јелена Рајковић  
Број уписа 34/07  
Студијски програм докторске академске студије биологије  
Наслов рада Упоредна анализа ефеката холекалциферола и алфакалцидола као саставних делова имплантата на процес зарастања дефеката у фемуру овариектомисаних пацова  
Ментор др Стево Најман

Потписани Јелена Рајковић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Крагујевцу.

**Потпис аутора**

У Крагујевцу, 18.08.2015

Јелена Рајковић

### ОБРАЗАЦ 3.

#### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Упоредна анализа ефеката холекалциферола и алфакалцидола као саставних делова имплантата на процес зарастања дефеката у фемуру оваријектомисаних пацова која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, чији је кратак опис дат је на обрасцу број 4.).

**Потпис аутора**

У Крагујевцу, 18.08.2015

Јелена Рајковић



#### **ОБРАЗАЦ 4.**

**1. Ауторство -**

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

**2. Ауторство – некомерцијално.**

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

**3. Ауторство - некомерцијално – без прераде.**

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

**4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима.**

Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

**5. Ауторство – без прераде.**

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

**6. Ауторство - делити под истим условима.**

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