

UNIVERZITET U BEOGRADU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Jelena N. Radovanović Dimitrijević

**SUBAKUTNA TOKSIČNOST FLUORIDA I PROTEKTIVNI
EFEKAT SELENA KOD EKSPERIMENTALNOG
ŽIVOTINJSKOG MODELA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Jelena N. Radovanović Dimitrijević

**SUBACUTE FLUORIDE TOXICITY AND SELENIUM
PROTECTIVE EFFECT IN EXPERIMENTAL ANIMAL
MODEL**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2022.

Mentor:

dr sc. Zoran Mandinić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Stomatološki fakultet

Mentor:

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

Članovi komisije:

dr sc. Jelena Mandić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Stomatološki fakultet

dr sc. Sanja Milutinovic-Smiljanić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Stomatološki fakultet

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

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

dr sc. Emina Sudar-Milovanović, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za nuklearne nauke Vinča, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr sc. Stoimir Kolarević, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Svojom odlukom broj _____ od _____ 2022. godine, Veće naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu je potvrdilo da kandidat Jelena N. Radovanović Dimitrijević može da pristupi javnoj odbrani svoje doktorske disertacije pod naslovom: „Subakutna toksičnost fluorida i protektivni efekat selena kod eksperimentalnog životinjskog modela“.

Datum i mesto javne odbrane: _____

Neizmerno se zahvaljujem mojim mentorima prof. dr Zoranu Mandiniću i prof. dr Biljani Antonijević na savetima i podršci iskazanim tokom izrade doktorske disertacije, kao i na pruženoj šansi da budem deo njihovog tima.

Veliko hvala svim saradnicima sa Katedre za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“ Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na divnoj saradnji i savetima.

Zahvaljujem se prof. dr Zorici Bulat, prof. dr Marijani Ćurčić, Katarini Baralić i Dragani Javorac, na uloženom vremenu i svim pruženim odgovorima, kojih je bilo puno.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Esmi R. Isenović na svim savetima, pomoći i podršci, kao i na tome što me je uvela u svet nauke.

Neizmerno hvala mojim kolegama iz Laboratorije za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Instituta za nuklearne nauke „Vinča” dr Milanu Obradoviću, dr Sonji Zafirović, MSc Katarini Banjac, MSc Anastasiji Pajčin, dr Julijani Stojanović, dr Božidarki Zarić, dr Sanji Soskić, dr Vladanu Bajiću I dr Mirjani Mačvanin na podršci, kolegijalnosti i prijateljstvu koje su iskazali tokom izrade ove doktorske disertacije. Veliko hvala dr Emini Sudar-Milovanović koja je bila tu za mene, u svim trenucima.

Hvala prof. dr Sanji Milutinovic-Smiljanić i dr Stoimiru Kolareviću na pomoći i podršci koju su mi pružili tokom sprovođenja eksperimenata i pisanja disertacije.

Zahvaljujem se dr Snežani Pašalić, dr Jeleni Marinković i MSc Milici Ćurčić na podršci i prijateljstvu.

Hvala prof. dr Momiru Careviću što mi je ukazao na značaj preventivne stomatologije kao i na bezuzlovnoj podršci.

Hvala dr Nataši Medić Milijić sa Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije i dr vet. med Vladimiru Milovanoviću sa Instituta “Torlak” na tehničkoj pomoći za realizaciju eksperimenta.

Zahvaljujem se prijateljima i mojoj porodici, tati Nikoli, mami Vesni, sestri Maji, suprugu Nikoli i Makiju na strpljenju, podršci i veri da ću uspeti u svojoj nameri da postanem deo naučnog sveta.

Subakutna toksičnost fluorida i protektivni efekat selena kod eksperimentalnog životinjskog modela

Sažetak

Profilaktička upotreba fluorida (F^-) ima pozitivne efekte na očuvanje zubnih tkiva. Ipak, prekomeran unos F^- može doprineti razvoju lokalne i/ili sistemske toksičnosti. Lokalna toksičnost izazvana prekomernim unosom F^- se može manifestovati fluorozom zubnih tkiva, dok sistemska toksičnost najčešće dovodi do promena u skeletu. Visoke koncentracije F^- imaju negativan uticaj i na različita meka tkiva ljudi i životinja. Selen (Se) se smatra bioelementom koji pozitivno utiče na antioksidativni sistem, enzime metabolizma i reparaciju DNK, neutrališe slobodne radikale i ispoljava antikarcinogena svojstva. Suplementacija Se sprečava nastanak oksidativnog stresa koji može biti izazvan štetnim nivoima F^- . Međutim, evidentan je nedostatak studija koje prikazuju mehanizme zajedničkog delovanja Se i F^- .

Hipoteza ove doktorske disertacije jeste da će primena rastućih koncentracija F^- putem vode za piće nakon 28 dana izazvati oštećenja različitih organa kod *Wistar* pacova. Osim toga, pretpostavljeno je da će antioksidans Se antagonizovati oštećenja izazvana F^- . U skladu sa postavljenom hipotezom, osnovni ciljevi ove disertacije su ispitivanje mehanizama potencijalne subakutne toksičnosti rastućih koncentracija F^- (10, 25, 50, 100 i 150 mg/l) kod mužjaka *Wistar* pacova na parametre redoks statusa, koncentracije bioelemenata, oštećenja DNK i histološku strukturu tkiva, izučavanje modela dozne zavisnosti efekata F^- , kao i ispitivanje potencijalnog protektivnog efekta Se na subakutnu toksičnost izazvanu F^- u različitim tkivima pacova.

Rezultati ove studije su pokazali da subakutna ekspozicija povišenim koncentracijama F^- dovodi do morfoloških oštećenja više tkiva pacova, a najizraženija su u jetri i bubrezima. Fluoridi su uticali na parametre redoks statusa, u najvećoj meri na aktivnost superoksid anjona i nivo sulfhidrilnih grupa, i malondialdehida, kao i na aktivnost superoksid dismutaze u plazmi, jetri, bubrezima, slezini, mozgu i testisima pacova. Fluoridi su uticali na disbalans koncentracija bakra, cinka, gvožđa i mangana u krvi, mekim i kalcifikovanim tkivima. Genotoksični potencijal F^- je potvrđen u jetri, slezini, mozgu i testisima. Subakutna ekspozicija F^- nije uticala na telesnu masu pacova, niti je zabeležena fluoroza zubnih tkiva. Osim toga, rezultati su pokazali da Se nije uticao na smanjenje morfoloških oštećenja jetre i bubrege, ali je značajno smanjio oštećenja DNK u jetri i slezini. Antioksidativni efekat Se potvrđen je pozitivnim uticajem na pojedine parametre redoks statusa, ali, Se je ispoljio i oksidativni efekat u pojedinim tkivima. Na koncentracije bioelemenata, Se je sa F^- delovao antagonistički, ali i sinergistički. Efekti F^- na superoksid anjon, totalni oksidativni status, totalni antioksidativni status, aktivnost superoksid dismutaze, sulfhidrilne grupe, malondialdehid, oksidaciju proteina, bakar, cink, gvožđe, mangan i DNK oštećenje su dozno zavisni.

Na osnovu rezultata ove disertacije možemo zaključiti da subakutna ekspozicija povišenim koncentracijama F^- dovodi do oštećenja organa putem različitih mehanizama toksičnosti: poremećaja parametara redoks statusa, oštećenja DNK, disbalansa bioelemenata i morfoloških oštećenja tkiva. Selen je u nekim organima smanjio oštećenje izazvano F^- i ispoljio antagonistička svojstva, ali ne na svim nivoima delovanja. Stoga, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da povišene koncentracije F^- dovode do sistemske toksičnosti, kao i da Se u određenoj meri može smanjiti oštećenja izazvana F^- . Međutim, sinergizam F^- i Se nam ukazuje da njihova istovremena upotreba može dodatno uticati na disbalans pojedinih bioelemenata, i rezultati ove disertacije mogu biti vredni budućih ispitivanja, imajući u vidu čestu upotrebu ovih suplemenata.

Ključne reči: fluoridi, selen, oksidativni stres, *Wistar* pacovi, genotoksičnost, subakutna toksičnost, bioelementi, *Benchmark* doza, komet test

Naučna oblast: Kliničke stomatološke nauke

Uža naučna oblast: Dečja i preventivna stomatologija

Subacute fluoride toxicity and selenium protective effect in an experimental animal model

Abstract

Prophylactic fluoride (F⁻) use has positive effects on tooth structure. However, excessive F⁻ consumption could cause local and/or systematic intoxication. Local F⁻ toxicity mainly manifests as tooth fluorosis, while systematic toxicity manifests through skeletal comorbidities. Investigations indicated that elevated F⁻ concentrations have a negative impact on different human and animal organs. Selenium (Se) is a bioelement that positively affects the antioxidative system, metabolic enzymes, and DNA repair. Further, Se can eliminate free radicals and manifest anticarcinogenic features. Selenium supplementation prevents oxidative stress and cell apoptosis caused by elevated F⁻ concentrations. However, there is a lack of studies that perceive mutual F⁻ and Se interactions.

The hypothesis of this doctoral dissertation is that application of increasing F⁻ concentrations through drinking water after 28 days will cause damage to various organs in *Wistar* rats. In addition, it is assumed that the antioxidant Se will antagonize the damage caused by F⁻. Following the hypothesis, the main objectives of this dissertation are to investigate the potential subacute toxicity of increasing F⁻ concentrations (10, 25, 50, 100, and 150 mg/l) in male *Wistar* rats on redox status, bioelement concentrations, DNA damage, and histological tissue structure, to study F⁻ dose-response effects, as well as investigation of the potential protective effect of Se on F⁻ subacute toxicity in various rat tissues.

The present study results showed that F⁻ subacute exposition at elevated doses can cause morphological tissue damage in rats, and the most prominent have been observed in the liver and kidneys. Fluoride affected redox status parameters, the level of superoxide anion, sulfhydryl groups, and malondialdehyde, as well as superoxide dismutase activity, in the blood, liver, spleen, brain, and testicles. Fluoride genotoxicity potential has been confirmed in the liver, spleen, brain, and testicles tissues. Further, F⁻ caused copper, zinc, iron, and manganese disbalance in the blood, soft and calcified tissues. Fluoride did not affect rats' body mass, nor dental fluorosis was observed. Selenium supplementation did not improve liver and kidney morphological damage. Nevertheless, Se significantly reduced DNA damage in the liver and spleen. Selenium manifested antioxidative properties, although in some tissues manifested oxidative features. In addition, the impact of Se on the F⁻ effect was both antagonistic and synergistic regarding bioelements concentrations. Fluoride impacts on superoxide anion, total oxidative status, total antioxidative status, superoxide dismutase activity, sulfhydryl groups, malondialdehyde, protein oxidation, copper, zinc, iron, manganese, and DNA damage were dose-dependent.

According to the results of this doctoral dissertation, we can conclude that subacute exposition to F⁻ at elevated concentrations causes tissue damage in *Wistar* rats via different toxicity mechanisms: redox status and bioelements disbalance, as well DNA, and morphological tissue damage. Furthermore, Se reduced fluoride-induced damage in some organs and manifested antagonistic features, but only via some toxicity mechanisms. Thus, the results of this doctoral dissertation indicate F⁻ systematic toxicity after subacute exposition to elevated concentrations and the possibility that Se could be a potential antagonist. However, Se and F⁻ synergism could additionally affect bioelements levels and consequently, having in mind their often mutual consumption, the results of this doctoral dissertation could contribute as a base for future investigations.

Keywords: fluoride, selenium, oxidative stress, *Wistar* rats, genotoxicity, subacute toxicity, bioelements, *Benchmark* dose, comet assay

Scientific field: Clinical dental sciences

Scientific subfield: Paediatric and preventive dentistry

SPISAK SKRAĆENICA

AOPP - uznapredovali produkti oksidacije proteina (engl. *advanced oxidation protein products*)

BMD - benčmark doza (engl. *benchmark dose*)

BMDL - engl. *benchmark dose lower confidence limit*

CAT - katalaza

CED - doza kritičnog efekta (engl. *critical effect dose*)

CES - veličina kritičnog efekta (engl. *critical effect size*)

GPx - glutation-peroksidaza

GSH - glutation

HAI - histološki indeks aktivnosti

IOJ - izuzetno oštećena jedra

MDA - malondialdehid

O₂^{·-} - superoksidni anjon

OS - oksidativni stres

PBS - fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*)

PROAST - engl. *Possible Risk Obtained from Animal Studies*

PTM - prinos telesne mase

ROS - reaktivne kiseonične vrste (engl. *reactive oxygen species*)

SH - sulfhidrilne grupe

SOD - superoksid dismutaza

t.m. - telesna masa

TAS - totalni antioksidativni status

TOS - totalni oksidativni status

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Fluor i fluoridi	1
1.1.1 Zastupljenost fluorida u hrani.....	1
1.1.2 Zastupljenost fluorida u vodi.....	2
1.1.3 Fluoridi i zagađenje životne sredine	2
1.1.4 Apsorpcija i eliminacija fluorida.....	3
1.1.5 Fluoridi u krvi.....	3
1.1.6 Mehanizam delovanja fluorida na zubna tkiva	3
1.1.7 Fluoridi u kostima i zubima.....	4
1.2 Upotreba fluorida u stomatologiji	4
1.3 Toksičnost fluorida	6
1.3.1 Fluoroza zuba.....	6
1.3.1.1 Indeksi fluoroze zuba	7
1.3.2 Sistemska toksičnost fluorida	7
1.4 Problem povećane koncentracije fluorida u Srbiji	8
1.5 Mehanizmi toksičnosti fluorida	8
1.6 Slobodni radikali i oksidativni stres	9
1.6.1 Fluoridi i oksidativni stres	10
1.7 Fluoridi i bioelementi	11
1.8 Genotoksičnost fluorida	11
1.9 Selen	12
1.9.1 Fizičke i hemijske osobine selena	12
1.9.2 Metabolizam selena	12
1.9.3 Značaj i uloga selena	13
1.9.4 Fluoridi i selen.....	13
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	14
3. MATERIJAL I METODE	15
3.1 Hemikalije i reagensi.....	15
3.2 Eksperimentalni protokol	15
3.2.1 Postupak pripreme krvi pacova	17
3.2.2 Postupak pripreme tkiva pacova.....	17
3.3 Određivanje koncentracije fluorida u tkivima	17
3.3.1 Određivanje potencijala fluoridnih jona	18
3.4 Histološka i histomorfometrijska analiza	18

3.5	Određivanje redoks statusa u plazmi i tkivima	19
3.5.1	Priprema homogenata tkiva	20
3.5.2	Određivanje koncentracije proteina u homogenatima tkiva.....	20
3.5.3.	Određivanje biomarkera redoks statusa	20
3.5.3.1	Određivanje koncentracije superoksidnog anjona	20
3.5.3.2	Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze	20
3.5.3.3	Određivanje koncentracije malondialdehida.....	21
3.5.3.4	Određivanje totalnog oksidativnog statusa	21
3.5.3.5	Određivanje totalnog antioksidativnog statusa	21
3.5.3.6	Određivanje ukupnih sulfhidrilnih grupa.....	21
3.5.3.7	Određivanje uznapredovalih proizvoda oksidacije proteina.....	21
3.6	Određivanje koncentracije bioelemenata.....	22
3.7	Komet test.....	22
3.7.1	Priprema ćelijske suspenzije.....	22
3.8	Statistička analiza	24
4.	REZULTATI	26
4.1	Telesna masa eksperimentalnih životinja i unos vode.....	26
4.2	Distribucija fluorida u jetri, bubrezima, slezini, mozgu, testisima, zubima i femuru pacova koji su pili vodu sa rastućim koncentracijama fluorida	28
4.3	Histološke analize	32
4.3.1	Patohistološki nalaz jetre pacova tretiranih rastućim koncentracijama fluorida	32
4.3.2	Patohistološki nalaz jetre pacova tretiranih fluoridima i selenom.....	35
4.3.3	Histološka i histomorfometrijska analiza jetre-histološki indeks aktivnosti (HAI engl. histological activity index).....	36
4.3.4	Patohistološki nalaz bubrega pacova tretiranih rastućim koncentracijama fluorida	37
4.3.5	Patohistološki nalaz bubrega pacova tretiranih fluoridima i selenom	40
4.3.6	Patohistološki nalaz mozga pacova tretiranih rastućim koncentracijama fluorida i selenom	41
4.3.7	Patohistološki nalaz slezine pacova tretiranih rastućim koncentracijama fluorida i selenom	42
4.3.8	Patohistološki nalaz femura i zuba pacova tretiranih rastućim koncentracijama fluorida i selenom	43
4.4	Biomarkeri redoks statusa.....	44
4.4.1	Uticaj fluorida na redoks status u plazmi pacova.....	44
4.4.1.1	Odnos doze i efekta fluorida na parametre redoks statusa u plazmi.....	46
4.4.2	Uticaj fluorida na redoks status u jetri pacova.....	47
4.4.2.1	Odnos doze i efekta fluorida na parametre redoks statusa u jetri	49
4.4.3	Uticaj fluorida na redoks status u bubrezima pacova.....	52

4.4.3.1	Odnos doze i efekta fluorida na parametre redoks statusa u bubrezima	53
4.4.4	Uticaj fluorida na redoks status u slezini pacova	56
4.4.4.1	Odnos doze i efekta fluorida na parametre redoks statusa u slezini.....	57
4.4.5	Uticaj fluorida na redoks status u mozgu pacova.....	59
4.4.5.1	Odnos doze i efekta fluorida na parametre redoks statusa u mozgu	60
4.4.6	Uticaj fluorida na redoks status u testisima pacova	63
4.4.6.1	Odnos doze i efekta fluorida na parametre redoks statusa u testisima	64
4.4.7	Uticaj suplementacije selenom na redoks status u plazmi pacova	66
4.4.8	Uticaj suplementacije selenom na redoks status u jetri pacova	67
4.4.9	Uticaj suplementacije selenom na redoks status u bubrezima pacova	69
4.4.10	Uticaj suplementacije selenom na redoks status u slezini pacova	71
4.4.11	Uticaj suplementacije selenom na redoks status u mozgu pacova	72
4.4.12	Uticaj suplementacije selenom na redoks status u testisima pacova.....	74
4.5	Koncentracije bioeleminata kod <i>Wistar</i> pacova	76
4.5.1	Uticaj fluorida na bioelemente eksperimentalnih životinja.....	76
4.5.1.1	Koncentracije bioeleminata u mekim tkivima	76
4.5.1.2	Odnos doze i efekta fluorida na bioelemente u mekim tkivima	78
4.5.1.3	Koncentracije bioeleminata u kalcifikovanim tkivima.....	85
4.5.1.4	Odnos doze i efekta fluorida na bioelemente u kalcifikovanim tkivima.....	86
4.5.2	Uticaj suplementacije selenom na bioelemente eksperimentalnih životinja	88
4.5.2.1	Koncentracije bioeleminata u mekim tkivima	88
4.5.2.2	Koncentracije bioeleminata u kalcifikovanim tkivima.....	90
4.6	Genotoksični efekat fluorida.....	91
4.6.1	Uticaj fluorida i/ili selena na ćelijsku vijabilnost i učestalost izuzetno oštećenih jedara	91
4.6.2	DNK oštećenje jedara testisa, jetre, krvi, mozga i slezine.....	93
4.6.3	Odnos doze i efekta fluorida na oštećenje DNK	97
4.7	Korelacione analize	98
4.7.1	Korelacione analize između eksternih koncentracija i internih doza fluorida	98
4.7.2	Korelacione analize između odnosa eksternih i internih doza fluorida.....	99
5.	DISKUSIJA.....	100
5.1	Distribucija fluorida u tkivima.....	101
5.2	Telesna masa pacova i unos vode	101
5.3	Uticaj fluorida na patohistološke promene tkiva pacova.....	102
5.4	Uticaj selena na patohistološke promene tkiva pacova	104
5.5	Uticaj fluorida na biomarkere redoks statusa kod pacova	104
5.6	Uticaj selena na biomarkere redoks statusa kod pacova	108
5.7	Uticaj fluorida na bioelemente kod pacova	108

5.7.1 Uticaj fluorida na koncentracije bioelemenata u mekim tkivima eksperimentalnih životinja	109
5.7.2 Uticaj fluorida na koncentracije bioelemenata u kalcifikovanim tkivima eksperimentalnih životinja	110
5.8 Efekat suplementacije selenom na bioelemente kod eksperimentalnih životinja	110
5.8.1. Efekat suplementacije selenom na koncentracije bioelemenata u mekim tkivima.....	110
5.8.2. Efekat suplementacije selenom na koncentracije bioelemenata u kalcifikovanim tkivima	111
5.9 Genotoksičnost fluorida	111
6. ZAKLJUČCI.....	114
7. LITERATURA	115
8. BIOGRAFIJA.....	136

1. UVOD

U poslednje dve decenije, fluoridi (F^-) su u centru istraživanja zbog svojih jedinstvenih osobina i primeni u svakodnevnom životu (Gillis i sar., 2015). Fluoridi se svakodnevno koriste usled protektivnog delovanja na zubna tkiva (Lindahl i Mahmood 2009). Zatim, u savremenoj farmaceutskoj industriji, F^- imaju značajnu ulogu s obzirom da povećavaju bioaktivnost i metaboličku stabilnost preparata (Han i sar., 2021). Ipak, prekomeran unos F^- može dovesti do lokalne i sistemske toksičnosti (Vieira 2021). Imajući u vidu svakodnevnu upotrebu i prisutnost F^- , izučavanje interakcije F^- sa drugim elementima je od velikog značaja (Khandare i sar., 2018; Dehnen i sar., 2021; Shao i sar., 2022). Selen (Se) je bioelement koji se često koristi kao suplement s obzirom da poseduje antioksidativna svojstva, a njegov uticaj na oštećenja izazvana F^- poslednjih godina je predmet brojnih istraživanja (Gao i sar., 2019; Chen i sar., 2022).

1.1 Fluor i fluoridi

Fluor je izuzetno reaktivan i visoko elektronegativan element (3,98 na Paulingovoj skali elektronegativnosti, u poređenju sa 2,20 za vodonik, 3,44 za kiseonik i 2,55 za ugljenik (Gillis i sar., 2015) i sastavni je deo atmosfere, litosfere, biosfere i hidrosfere (Kanduti i sar., 2016). Fluor je gas blede žuto-zelene boje, 17-ti element po rasprostranjenosti i čini 0,06-0,09% Zemljine kore (O'Mullane i sar., 2016). Iako je najzastupljeniji halogeni element na Zemlji, fluor se retko nalazi u elementarnom stanju zato što su tri najčešća izvora fluora: kalcijum-fluorid, fluoroapatit i kriolit gotovo nerastvorljivi u vodi, osim toga ima visok oksidacioni potencijal (3,06 V) koji onemogućava proces njegove halogenizacije kao i zbog visoke vrednosti hidratacije jona F^- (490 kJ/mol) koja ga čine slabim nukleofilom (Jacobson 1996; Carvalho i Oliveira 2017; Han i sar., 2021). Fluor je najčešće u kombinaciji sa elementima sa kojima (izuzev sa kiseonikom i plemenitim gasovima) formira F^- (Chan i O'Hagan 2012).

Fluoridi imaju jaku tendenciju da u vodenim rastvorima formiraju jedinjenja sa metalima, najčešće sa gvožđem (Fe), manganom (Mn), aluminijumom i cirkonijumom (WHO 1984). Fluorovodonik (fluorovodonična kiselina) nastaje od minerala kalcijum-fluorida i sumporne kiseline, i pretežno se koristi za sintezu kriolita i fluorovanih ugljovodonika (koji se koriste za proizvodnju aluminijuma, teflona i freona). Natrijum-fluorid je najznačajniji alkalni fluorid i dobija se neutralizacijom vodenog rastvora fluorovodonika natrijum-karbonatom ili natrijum-hidroksidom (WHO 1984).

Alkalni F^- su soli, imaju visoku tačku topljenja i veoma dobro se rastvaraju u vodi. Fluoridi su sastavni deo prirode i njihova adekvatna upotreba ima brojne pozitivne efekte na očuvanje funkcija organizma (WHO 1994; Aoun i sar., 2018). Glavni izvori F^- su hrana i voda, ali se mogu naći u Zemljinoj kori u sklopu različitih minerala. Minerali koji sadrže F^- uglavnom su vulkanskog porekla. U kontaktu sa vodom, ovi minerali se rastvaraju u zavisnosti od fizičko-hemijskih osobina samih minerala kao i vode (pH i temperatura vode, poroznost minerala itd.) (Sellers 2004).

1.1.1 Zastupljenost fluorida u hrani

Koncentracija F^- u hrani je najčešće niska, između 0,1 i 2,5 mg/kg. Fluoridi su zastupljeni u gotovo svakoj vrsti namirnica, ali veće koncentracije su izmerene u koncentrovanom proteinu riba

(između 21 mg/kg i 761 mg/kg) i određenim vrstama biljaka koje se koriste kao čajevi, lešniku i pirinču (O'Mullane i sar., 2016; WHO 2019; Jáudenes Marrero i sar., 2020). Programi fluorisanja mleka i soli predstavljaju ekonomski povoljne mere, i trenutno se sprovode u oko 14 zemalja širom sveta radi prevencije nastanka karijesa zubnih tkiva (Bánóczy i sar., 2013). Fluorisana so sadrži 200-250 mg F⁻/kg i može doprineti povišenom unosu F⁻ u organizam (0,5-0,75 mg/dan) (EFSA 2013; Guth i sar., 2020), stoga se ne preporučuje kombinacija fluorisane vode i fluorisane soli (Aoun i sar., 2018).

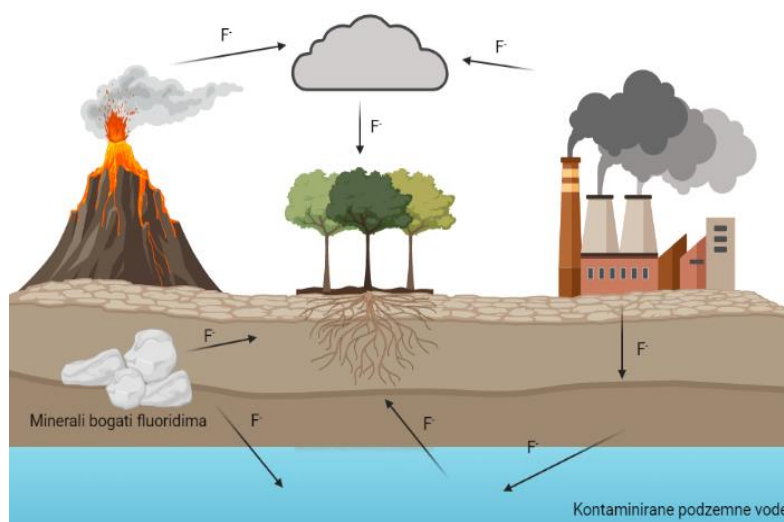
1.1.2 Zastupljenost fluorida u vodi

Voda predstavlja glavni izvor F⁻, i sve vode sadrže F⁻ u određenoj koncentraciji (Aoun i sar., 2018). Podzemne vode predstavljaju najveći izvor vode za piće (Karthikeyan i Lakshmanan 2011). Morska voda sadrži F⁻ u koncentraciji od 1,2 do 1,5 mg/l (ppm) (Kanduti i sar., 2016), dok slatka voda poreklom iz jezera, reka i izvora sadrži niže koncentracije od 0,01 do 0,3 mg/l (Kanduti i sar., 2016). Ipak, u pojedinim područjima zabeležene su izuzetno visoke koncentracije F⁻ u termalnim vodama. Vulkanske stene kao i depoziti morske soli takođe sadrže značajne količine F⁻, čak do 2500 mg/kg i njihova koncentracija raste sa porastom dubine na kojoj se nalaze. Najviša koncentracija F⁻ u vodi je zabeležena u Keniji, u jezeru Nakuru, od čak 2800 mg/l (O'Mullane i sar., 2016).

Fluorisanje vode podrazumeva kontrolisano dodavanje F⁻ u javni vodovod, i predstavlja izuzetno efikasnu metodu za smanjenje prevalencije karijesa. Počeci fluorisanja vode datiraju iz 40-ih godina 20. veka u Americi i Kanadi (Marthaler 2013). Optimalna koncentracija F⁻ u vodi za piće iznosi 0,5-1,0 mg/l (WHO 2019). Prosečan unos F⁻ putem vode i drugih tečnosti u Evropi iznosi 0,13 mg dnevno (1,86 µg/kg telesne mase (t.m.) dnevno, za odraslu osobu prosečne t.m. od 70 kg). Fluorisanje vode u Evropi se sprovodi u neki delovima Velike Britanije, Portugala, Španije i Irske (Guth i sar., 2020).

1.1.3 Fluoridi i zagađenje životne sredine

Fluoridi mogu biti prisutni u kontaminiranoj hrani, vazduhu, zemljištu i u vodi u visokim koncentracijama, kao posledica korišćenja pesticida sa F⁻, industrijskog zagađenja iz fabrika stakla, aluminijuma, keramike, cementa, i mogu dostići nivo od 1,4 mg/m³ (Slika 1) (Cape i sar., 2003; O'Mullane i sar., 2016). Fluor koji se oslobađa u atmosferu je visoko reaktivan i direktno reaguje sa vodom, formirajući fluorovodonik koji dalje formira stabilne F⁻ (Walna i sar., 2013). Dokazano je da životinje koje žive na području sa visokim koncentracijama F⁻ u zemljištu, atmosferi i vodi, imaju povišene nivoe F⁻ u tkivima, kao i u mleku i jajima (Gupta i sar., 2015; Bombik i sar., 2020).



Slika 1. Kruženje fluorida u prirodi (Slika je nacrtana pomoću sajta BioRender.com (2020)).

1.1.4 Apsorpcija i eliminacija fluorida

Apsorpcija alkalnih F^- se najvećim delom odvija preko gastrointestinalnog trakta (90%), tj. preko želuca i preko proksimalnog dela tankog creva procesom difuzije (Buzalaf i Whitford 2011; Martínez-Mier 2011). Poluvreme apsorpcije okvirno iznosi 30 minuta i veća je iz tečnosti nego iz hrane. Apsorpcija preko oralne mukoze je ograničena, s obzirom na retenciju F^- na oralnim tkivima (Zero i sar., 1992; O'Mullane i sar., 2016). Fluoridi se najvećim delom izlučuju preko bubrega tj. glomerularnih kapilara i ekskrecija direktno zavisi od urinarnog pH. Ukoliko je urinarni pH kiseo usled neadekvatne ishrane, primene lekova ili određenih sistemskih poremećaja, može doći do retencije F^- u organizmu. Takođe, usled bubrežne insuficijencije, može doći do povećane koncentracije F^- u svim tkivima organizma (O'Mullane i sar., 2016). Odrasli zadržavaju oko 35% F^- , dok deca imaju povećanu retenciju F^- (oko 50 %) usled velikog broja širokih koštanih lakuna, karakterističnih za period razvitka skeleta (Buzalaf i Whitford 2011; O'Mullane i sar., 2016). U industrijskim područjima, velike količine F^- (najčešće fluorovodonika) se u organizam unose preko respiratornog trakta i deponuju u nazofaringsu, traheji i alveolama (WHO 1984; WHO 2000). Fluoridi se u malom procentu izlučuju preko fecesa i mleka tokom perioda laktacije (Villa i sar., 2010; EFSA 2013).

1.1.5 Fluoridi u krvi

Apsorbovani F^- se prvo distribuiraju u krv, zatim u druge organe ili eliminišu putem urina. Oko 75% F^- u krvi se nalazi u plazmi a ostatak uglavnom u crvenim krvnim zrnima. U krvnoj plazmi ljudi F^- su vezani za proteine plazme i mogu se naći u dva oblika: jonskom i organskom (O'Mullane i sar., 2016). 20-60 minuta nakon ingestije u plazmi se postiže maksimalna koncentracija F^- , koja uglavnom iznosi oko 0,006 mg/l (Buzalaf i Whitford 2011). Koncentracije F^- su od velikog interesa u stomatologiji i medicini, s obzirom da su u direktnoj korelaciji sa količinom unetih F^- u organizam (O'Mullane i sar., 2016).

1.1.6 Mehanizam delovanja fluorida na zubna tkiva

Poznavanje mehanizama dejstva F^- je od izuzetnog značaja, kako bi se rizik od štetnih efekata sveo na minimum. Fluoridi smanjuju rastvaranje kalcijum hidroksiapatita u uslovima povećanog stvaranja mlečne kiseline i sprečavaju demineralizaciju gleđi. Mlečna kiselina nastaje kao proizvod bakterija (pretežno *Streptococcus mutans*-a) nakon metabolizma šećera, i ukoliko dođe do drastičnog smanjenja pH vrednosti, dolazi do demineralizacije gleđi. S obzirom da je početna demineralizacija gleđi reverzibilan proces, adekvatnom primenom profilaktičkih mera, poput aplikacije F^- , demineralizacija se može zaustaviti. Joni F^- se ugrađuju u površinu kristalnih rešetki gleđi i formiraju fluorohidroksiapatit čime započinju proces remineralizacije. Joni F^- mogu delovati i na metabolizam ćelija bakterija (inhibicijom glikolitičkih enzima ATP-aza) i pH citoplazme, čime se smanjuje proizvodnja kiseline u procesu glikolize. Sistemska i lokalna primena F^- dovodi do smanjenja incidence karijesa u fisurama i jamicama prvih stalnih molara (ten Cate i van Loveren 1999; Buzalaf i Whitford 2011). Fluoridi protektivno deluju i na dentin, koji je podložniji nastanku karijesa i bržoj demineralizaciji usled povećane vrednosti pH, u odnosu na gleđ (Buzalaf i Whitford 2011).

Protektivno delovanje F^- na gleđ zuba se može ostvariti sledećim mehanizmima:

1. Formiranje fluoroapatita na površini gleđi, zamenom hidroksilnih jona sa jonom F^- u kalcijum hidroksiapatitu. Fluoroapatit smanjuje propustljivost kalcijum hidroksiapatita, tj. čini gleđ zuba otpornijom na delovanje kiselina koje se proizvode od strane patogenih bakterija;
2. Inhibicija enzima enolaze, čime dolazi do redukcije stvaranja mlečne kiseline;
3. Bakteriostatsko dejstvo (uticaj na regulaciju mRNK bakterija) (Levine 2011; Ma i sar., 2014).

1.1.7 Fluoridi u kostima i zubima

Koncentracija F^- u kostima i zubima zavisi od brojnih faktora, uključujući vreme ekspozicije, dozu F^- , starosnu dob, pol, oblik unetih F^- itd. Istraživanja ukazuju da se otprilike polovina apsorbiranih F^- deponuje u skeletu i njihova koncentracija raste sa godinama starosti. Trabekularne kosti sadrže više F^- u poređenju sa kompaktnim kostima (WHO 1984; Everett 2011).

Koncentracija F^- u gleđi je izuzetno visoka (najviša je u spoljašnjem sloju gleđi), i delom se u gleđ ugrađuju tokom maturacije zuba, a delom i nakon erupcije. Cement i dentin zuba takođe sadrže F^- i pojedine studije ističu da je i nivo F^- u dentinu direktno povezan sa stepenom fluoroze zuba (Vieira i sar., 2004). Adekvatna profilaktička primena visokih doza F^- utiče i na reparaciju početnih oštećenja dentina i remineralizaciju cementa korena zuba (Moseley i sar., 2003; Petersson 2013; Mahesh i sar., 2020).

1.2 Upotreba fluorida u stomatologiji

Pozitivni efekti primene F^- zabeleženi su 1945. godine, kada je uvedeno sistemsko fluorisanje vode za piće sa 1 mg/l F^- , što je rezultiralo smanjenjem incidence karijesa za 50% (Mullen 2005). Profilaktička primena F^- je dala izuzetne rezultate u terapiji rane karijesne lezije gleđi (Slayton i sar., 2018; Urquhart i sar., 2019). Ovi rezultati su doveli do široke primene fluorisanja vode za piće, ali i soli, mleka, kao i povećane proizvodnje suplemenata koji su bogati F^- (Petersen i Lennon 2004). S obzirom da uticaj F^- na ljudski organizam zavisi od doze i vremena ekspozicije, neophodno je obezbediti njihov optimalan unos kroz profilaktičke mere.

Upotreba profilaktičkih sredstava sa F^- u stomatologiji (pasti za zube, rastvora za ispiranje usta, gelova i lakova za lokalnu aplikaciju, tableta) predstavlja bitan izvor F^- . Preporučene profilaktičke koncentracije F^- imaju pozitivan uticaj na gleđ zuba usled ometanja glikolize, i pozitivno utiču na remineralizaciju zubne gleđi. Sa druge strane, povišene doze F^- , koje se mogu naći i u zemljištu, solima i vodi u pojedinim geografskim lokalitetima, mogu dovesti do patofizioloških promena u ljudskom organizmu. Fluoroza zuba i skeleta predstavlja glavne posledice produžene ekspozicije visokim koncentracijama F^- (WHO 2019).

Protektivni efekat F^- se najbolje ispoljava njihovom lokalnom primenom odnosno, direktnim kontaktom sa gleđi (Petersen i Lennon 2004), uz adekvatnu oralnu higijenu i upotrebu paste za zube i tableta u kojima se F^- nalaze. Proizvodi sa visokom koncentracijom F^- koji se koriste u stomatologiji su paste za zube, rastvori za ispiranje usta, gelovi i lakovi za lokalnu aplikaciju, kao i tablete sa F^- . Paste sa F^- sadrže između 1000 i 1450 mg/kg F^- (O'Mullane i sar., 2016). Kod male dece treba biti oprezan za upotrebom pasti sa F^- usled potencijalne ingestije (Wong i sar., 2011). Iz tog razloga, preporučuje se obavezan nadzor roditelja kod dece starosti do sedam godina, kao i primena paste sa odgovarajućom koncentracijom F^- za uzrast deteta (Tabela 1). Paste sa visokim koncentracijama F^- (preko 5000 mg/kg) se propisuju isključivo pacijentima sa posebnim potrebama, sa fiksnim ortodontskim aparatima i osobama sa visokim rizikom za nastanak karijesa (Pretty 2016). Upotreba gelova (5000-12 300 mg/kg F^-) i rastvora za ispiranje (225-900 mg/l F^-) se ne preporučuje kod dece mlađe od šest godina zbog mogućnosti zadesnog gutanja. Kod starije dece upotreba gelova i rastvora se preporučuje ukoliko je rizik za nastanak karijesa visok, isključivo u ordinaciji kod stomatologa (gelovi) ili uz nadzor roditelja (rastvori za ispiranje) (Toumba i sar., 2019). Upotreba pasti za zube sa

F⁻ predstavlja najbolju preventivnu meru za smanjenje incidence karijesa, s obzirom da je ekonomski prihvatljiva i pristupačna (Burt 1998). U Tabeli 1 su prikazane najnovije preporuke iz 2019. godine za upotrebu pasti sa F⁻ od strane Evropske akademije za dečju stomatologiju (EAPD).

Tabela 1. Preporučena koncentracija fluorida u pastama za zube za decu od strane Evropske akademije za dečju stomatologiju (EAPD) iz 2019. godine (Toumba i sar., 2019).

<i>Starost deteta</i>	<i>mg/kg (F⁻)</i>	<i>Učestalost korišćenja</i>	<i>Količina paste (g)</i>
Prvi zub-druga godina	1000	Dva puta dnevno	0,125 (zrno pirinča)
2-6 godina	1000	Dva puta dnevno	0,25 (zrno graška)
Preko 6 godina	1450	Dva puta dnevno	0,5-1,0 (1-1,5 cm)

* Veće koncentracije mogu biti preporučene u skladu sa rizikom od nastanka karijesa

Kod dece sa posebnim potrebama i sa povećanim rizikom za nastanak karijesa, pored pasti za zube, preporučuje se upotreba rastvora, lakova i gelova sa visokim koncentracijama F⁻ (Marinho i sar., 2013; Marinho i sar., 2016). U Tabeli 2 je prikazana preporuka za lokalnu primenu F⁻ od strane EAPD-a.

Tabela 2. Preporučena koncentracija fluorida u rastvorima, lakovima i gelovima za decu od strane Evropske akademije za dečju stomatologiju (EAPD) iz 2019. godine (Toumba i sar., 2019).

<i>Izvori fluorida (ppm)</i>	<i>Preporuka za upotrebu</i>
Gelovi (5000-12 300)	Ne koristiti kod dece mlađe od 6 godina usled rizika od ingestije. Kod starije dece, preporučuje se upotreba 2-4 puta godišnje, uz obavezan nadzor stomatologa.
Rastvori (225 na dnevnom nivou/900 na nedeljnom nivou)	Ne koristiti kod dece mlađe od 6 godina usled rizika od ingestije. Kod starije dece, preporučuje se upotreba 10 ml rastvora (tokom 1 minuta) uz obavezan nadzor roditelja.
Lakovi (22 600)	Koristiti kod dece mlađe od 6 godina i školske dece uz obavezan nadzor stomatologa.

1.3 Toksičnost fluorida

Pored toga što se F^- nalaze u vodi (prirodno ili dodato), oni su prisutni u velikom broju proizvoda koji se svakodnevno koriste u preventivnoj stomatologiji. Imajući u vidu veliki spektar izvora F^- , unos povišenih koncentracija je moguć (Ullah i sar., 2017). Optimalan dnevni unos F^- u obliku suplemenata iznosi 0,05 mg/kg/dan. Letalne doze za ljude variraju, od 16 do 64 mg/kg F^- za odrasle i od 3 do 16 mg/kg F^- za decu (Tylenda i sar., 2003).

Visoke koncentracije F^- se akumuliraju u organizmu, pre svega u kostima i zubima, odakle se dalje sporo oslobađaju. Organska jedinjenja fluora su visokorizična usled spore degradacije i akumulacije u prirodi, čime doprinose zagađenju vode, zemljišta i ozonskog omotača. Akutna toksičnost izazvana F^- je u najvećoj meri (oko 80%) zabeležena kod dece mlađe od šest godina, usled ingestije paste za zube ili rastvora za ispiranje koji sadrže F^- (Martínez-Mier 2011). Fluoridi imaju sposobnost reverzibilnog vezivanja za kalcijum (O'Mullane i sar., 2016) usled čega mogu ometati aktivnost proteolitičkih i glikolitičkih enzima. Akutno peroralno trovanje F^- se manifestuje stvaranjem fluorovodonične kiseline u želucu, koja prouzrokuje bol u stomaku, hipersalivaciju, mučninu, dijareju i povraćanje. Najteže komplikacije trovanja F^- su respiratorna paraliza, bubrežna i srčana insuficijencija. Inhalaciono unošenje F^- se manifestuje napadima sličnim kao kod astme i alergijskih reakcija (WHO 2019). Hronična toksičnost izazvana F^- najčešće nastaje usled konzumacije vode ili suplemenata koji sadrže visoke koncentracije F^- (Aoun i sar., 2018). Hronično trovanje F^- se manifestuje fluorozom zuba, deformitetima skeleta i mišićnom slabošću (DenBesten i Li 2011; Atukorala i Chang 2014).

Mehanizmi toksičnosti fluorida se mogu podeliti u nekoliko grupa (Martínez-Mier 2011):

1. Formiranje fluorovodonične kiseline, što rezultira oštećenjem tkiva usled niskih pH vrednosti;
2. Inhibicija funkcije nerava usled interakcije kalcijuma i F^- , što dovodi do hipokalcemije, samim tim i inhibicije funkcionisanja nerava;
3. Oštećenje ćelija usled inhibicije različitih enzima neophodnih za fiziološke funkcije ćelija;
4. Hipokalcemija i hipokalemija koje dovode do neuravnoteženosti elektrolita i poremećaja srčanog ritma;
5. Fluoridi oštećuju metabolizam kiseonika, smanjuju njegovu proizvodnju, i dovode do stvaranja vodonik peroksida. Takođe, F^- dovode do stvaranja slobodnih radikala.

Istraživanja na životinjama su pokazala da su visoke oralne doze kalcijum-hlorida (Heard i sar., 2001) ili magnezijum-sulfata efikasne i bezbedne za lečenje trovanja izazvanih F^- (Kao i sar., 2004). Prikazi kliničkih slučajeva sa pacijentima koji su preživeli akutna trovanja izazvana F^- su takođe ukazali na benefit primene soli kalcijuma i magnezijuma (Abukurah i sar., 1972; Su i sar., 2001).

1.3.1 Fluoroza zuba

Protektivna uloga F^- u očuvanju oralnog zdravlja je poznata i dokazana decenijama unazad. Ipak, imajući u vidu široku upotrebu suplemenata sa F^- , njihova upotreba treba da bude strogo kontrolisana od strane profesionalno obučenog osoblja. Takođe, postoje lokaliteti u kojima je visoka koncentracija F^- prisutna u pijaćoj vodi, što predstavlja dodatni rizik od izloženosti (Ullah i sar., 2017).

Povećana incidenca fluoroze zuba nastaje usled brojnih izvora F^- koji se svakodnevno kombinuju. Stomatološki proizvodi sa F^- su sve više u upotrebi, i ukoliko se uzmu u obzir hrana i

voda bogati F^- , potencijalni rizik za nastanak fluoroze zuba je visok usled kumulativnog efekta (DenBesten i Li 2011). Visoke koncentracije F^- u vodi za piće su glavni uzrok nastanka fluoroze zuba i promene se dešavaju kada je nivo F^- veći od 1,5 mg/l (DenBesten i Li 2011). U početnom stadijumu, fluoroza zuba se karakteriše beličastim promenama u gleđi u vidu horizontalnih linija, tj. povećanjem poroznosti. Sa povećanjem dužine ekspozicije i/ili doze F^- , promene na gleđi postaju izraženije tj. zubi postaju kredasto beli usled slabije mineralizacije. U slučajevima fluoroze zuba primetne su žućkasto-braon mrlje i oštećenje zubnog tkiva (DenBesten i Li 2011).

1.3.1.1 Indeksi fluoroze zuba

Jedna od prvih klasifikacija fluoroze zuba potiče iz 1934. godine koju je napravio H.T. Dean (Dean 1934). Po ovoj klasifikaciji, zubi koji su zahvaćeni fluorozom se opisuju u šest stadijuma. U prvom stadijumu se ne može sa sigurnošću potvrditi fluoroza, ali se preporučuje praćenje. Drugi i treći stadijumi su takozvani veoma blagi i blagi, gde se mogu uočiti početne sporadične beličaste promene. Četvrti stadijum je takozvani umereni, gde su beličaste promene prisutne na svim površinama zuba. Peti i šesti stadijumi se klasifikuju kao umereno ozbiljni i ozbiljni, gde je prisutna hipoplazija zuba, kao i očigledne duboke promene u vidu tamno-braon mrlja (Dean 1934). Iako je Dinova klasifikacija korišćena mnogo godina, smatra se da ne daje adekvatne informacije o rasprostranjenosti fluoroze zuba (Mabelya i sar., 1994). *Thylstrup&Fejerskov* indeks detaljnije opisuje razvoj dentalne fluoroze, tj. povezuje ekspoziciju F^- , kliničke simptome i histološke promene (Thylstrup i Fejerskov 1978; Mabelya i sar., 1994). *Thylstrup&Fejerskov* indeks se boduje od 0 do 9 i adekvatno opisuje razliku između početne i umerene fluoroze, predstavlja poboljšan indeks fluoroze zuba i smatra se prvim izborom (Mabelya i sar., 1994).

Thylstrup&Fejerskov indeks bodovanje:

- 0 normalna translucencija gleđi;
- 1 promene u vidu belih linija koje se mogu videti na svim površinama zuba;
- 2 opakne bele linije su kompaktnije i formiraju beličasta područja (karakteristično na incizalnoj ivici sekutića i vrhovima kvržica premolara i molara);
- 3 spajanje beličastih područja na svim površinama zuba;
- 4 celokupna površina zuba je mlečno bela;
- 5 celokupna površina zuba je opakna i primetna su oštećenja gleđi (do 2 mm u prečniku);
- 6 veći dijametar i spajanje mlečno belih promena, moguće frakture incizalnih ivica i vrhova kvržica;
- 7 fraktura gleđi na iregularnim površinama zuba;
- 8 fraktura gleđi na više od polovine površine zuba;
- 9 gubitak većine gleđne supstance zuba, izmenjena anatomija usled fraktura (Sherwood i sar., 2020).

Poslednjih godina, sa ciljem uspostavljanja preciznije dijagnoze i smanjenim vremenom potrebnim za ispitivanje, u fokusu je automatska detekcija i klasifikacija fluoroze zuba pomoću sistema dualnih kamera, odnosno, pomoću softvera (Liu i sar., 2018).

1.3.2 Sistemska toksičnost fluorida

Najčešću sistemsku manifestaciju prekomernog unosa F^- predstavlja skeletna fluoroza. Takođe, F^- mogu izazvati oštećenja različitih sistema organa kao što su urinarni (Luo i sar., 2017), respiratorni (Abdel-Gawad i sar., 2014), reproduktivni (Dhurvey i sar., 2017), digestivni (Kuang i sar., 2016; Lu i sar., 2017), nervni (Song i sar., 2017) ali i promenu hematoloških parametara (Miranda i sar., 2018).

Hronična ekspozicija, karakteristična za pojedina geografska područja sa prirodno povišenim koncentracijama F^- može rezultirati endemskom fluorozom. Najčešća endemska fluorozna je skeletna fluorozna i karakteriše se osećajem nelagodnosti ili bolom u predelu kostiju i zglobova, a može dovesti i do frakture kostiju kao najozbiljnije komplikacije. Pokazano je da su gojaznost i prekomeran unos ulja i masti, mogući faktori rizika za nastanak sistemske fluorozne, dok su povećan unos voća, vitamina A i folne kiseline protektivni faktori (Liu i sar., 2015). Fluoridi u dozi od 5 mg/kg/t.m. mogu ispoljiti toksičnost, dok doza od 15 mg/kg/t.m. može dovesti do letalnog ishoda. Simptomi i znaci akutnog trovanja F^- su mučnina, povraćanje, bolovi u abdomenu, hipokalcemija i hipokalemija, koje mogu dovesti do grčenja mišića i srčane aritmije (Martínez-Mier 2011).

Povišena koncentracija F^- u vodi za piće je direktno povezana sa apoptozom ćelija periferne krvi kod dece (Rocha-Amador i sar., 2011). Takođe, ustanovljena je povezanost visokih koncentracija F^- sa inhibicijom rasta folikula dlake (Wang i sar., 2010). Istraživanja sprovedena tokom prethodnih 10 godina ukazuju na genotoksičnost F^- preko mehanizama oksidativnog stresa (OS) i disfunkcije mitohondrija (Ribeiro i sar., 2017). Fluoridi mogu indukovati malformacije hromozoma i DNK molekula u različitim ćelijama ekperimentalnih životinja (Podder i sar., 2011; J i sar., 2013). Buduća epidemološka i ekperimentalna istraživanja su neophodna radi razjašnjavanja mehanizama toksičnosti F^- zarad bezbedne upotrebe u preventivnoj stomatologiji i prevenciji potencijalnih štetnih efekata kod ljudi i životinja (Ribeiro i sar., 2017).

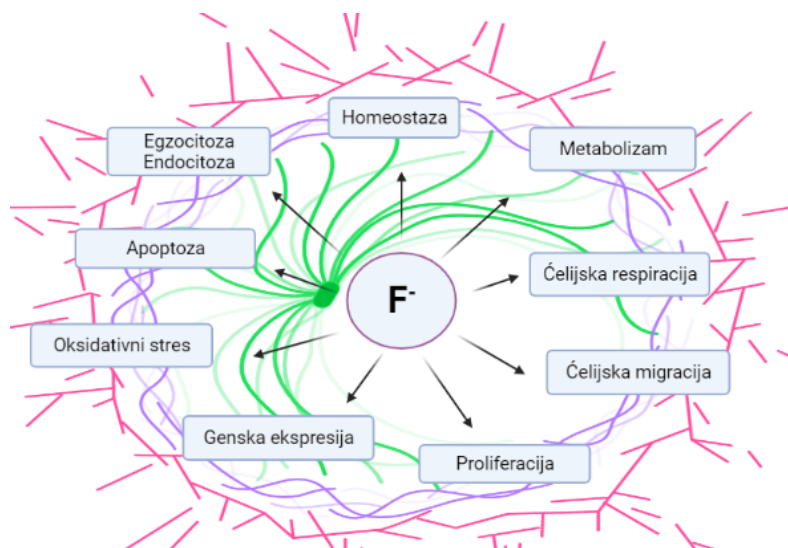
1.4 Problem povećane koncentracije fluorida u Srbiji

U pojedinim delovima Republike Srbije potvrđena je povišena koncentracija F^- u vodi i zemljištu (Mandinic i sar., 2009). Fluorozna zuba zabeležena je u područjima koja imaju problem sa centralnim izvorima pijaće vode, odnosno u kojima lokalno stanovništvo koristi vodu za piće iz bunara, koja je bogata F^- (Antonijevic i sar., 2016). Koncentracija F^- u vodi u Vranjskoj Banji dostiže vrednosti od 11 mg/l i sa prevalencijom fluorozne zuba od 16,7%, ovo područje se smatra područjem endemske fluorozne (Mandinic i sar., 2009). Na ovom području pokazana je korelacija nivoa F^- u kosi sa koncentracijom F^- u vodi za piće i incidencom fluorozne zuba kod dece (Mandinic i sar., 2010). Samim tim, uzorci kose mogu potencijalno biti korišćeni za procenu rizika hronične ekspozicije F^- (Mandinic i sar., 2010). U selu Ritopek, oblasti koja se nalazi 20 km od Beograda, ne postoji centralni sanitarno ispravan vodovod, već se koristi voda direktno iz bunara, kako za piće, tako i za zalivanje voća i povrća. Ustanovljeno je da 11% uzoraka analizirane vode koju koristi stanovništvo Ritopeka sadrži koncentracije F^- između 1,2 i 1,5 mg/l. Na ovom području kod dece starosti između 7-15 godina, zabeležena je prevalenca fluorozne zuba od čak 34,6%, i može se reći da ovi rezultati ukazuju na potencijalni zdravstveni problem od javnog značaja (Antonijevic i sar., 2016).

1.5 Mehanizmi toksičnosti fluorida

Uticaj F^- na ćelije zavisi od vrste ćelija, dužine ekspozicije kao i koncentracije F^- . Toksične efekte F^- u najvećoj meri ispoljavaju preko interakcije sa ćelijskim enzimima, poput fosfataza, gde se u većini slučajeva F^- ponašaju kao inhibitori aktivnosti enzima (Kashyap i sar., 2021). Osim toga, joni F^- utiču na funkciju mitohondrija i redukuju produkciju ATP-a. Mitohondrije su izvor reaktivnih vrsta kiseonika (ROS engl. *reactive oxygen species*), koje u patološkim stanjima mogu dovesti do oksidativnog disbalansa svih ćelijskih komponenti, uključujući proteine, lipide i nukleinske kiseline (Obradovic i sar., 2015; Obradovic i sar., 2020; Radovanovic i sar., 2021). DNK mitohondrija (mDNK) je sklona mutacijama koje se povezuju sa različitim neurodegenerativnim i tumorogenim oboljenjima (Taylor i Turnbull 2005). Fluoridi mogu ispoljiti negativan uticaj na ekspresiju i strukturu mDNK, inhibiraju respiraciju, i mogu dovesti do depolarizacije membrane mitohondrija (Aulestia i sar., 2020; Adkins i Brunst 2021). Povišena produkcija ROS dovodi do oksidacije makromolekula i oslobađanja slobodnih radikala koji utiču na membranske fosfolipide, dovode do lipidne

prekoxidacije, depolarizacije membrane mitohondrija i ćelijske apoptoze. Glavni mehanizmi toksičnosti F^- su povišena produkcija ROS i redukcija ćelijske antioksidativne zaštite. Slika 2 prikazuje uticaj F^- na različite ćelijske procese (Barbier i sar., 2010).



Slika 2. Uticaj fluorida na ćelije sisara (slika je preuzeta od (Barbier i sar., 2010). Modifikovano uz pomoć sajta BioRender.com (2020).

1.6 Slobodni radikali i oksidativni stres

Slobodni radikali su molekuli koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona i utiču na reaktivnost atoma ili molekula jer imaju sposobnost otpuštanja jednog elektrona i njegovog dodavanja drugim molekulima, menjajući njihova svojstva. Osim toga, slobodni radikali mogu i međusobno reagovati, odnosno graditi kovalentnu vezu preko nesparenih elektrona (Halliwell 2006). Slobodni radikali su široko zastupljeni u prirodi, a najzastupljeniji slobodni radikali su hidroksil radikal, superoksid anjon (O_2^-), prelazni metali poput Fe i bakra (Cu), azot monoksid (NO), i peroksinitrit (Betteridge 2000).

Mehanizmi delovanja slobodnih radikala su:

1. Dodavanje nesparenog elektrona neradikalnim jedinjenjima;
2. Oduzimanje jednog elektrona od neradikalnih jedinjenja (Halliwell 2006).

Oksidativni stres predstavlja disbalans između proizvodnje slobodnih radikala i antioksidativnog mehanizma odbrane, i ovaj disbalans može dovesti do oštećenja tkiva (Halliwell 1994). Ravnoteža između proizvodnje i eliminacije ROS može biti narušena usled različitih faktora, poput povišene temperature, teških metala, visoke radijacije, infekcija itd. Reaktivne vrste kiseonika imaju sposobnost da aktiviraju ili deaktiviraju različite vrste receptora, proteine, jone i druge signalne molekule i mogu oštetiti ćelijske komponente: proteine, lipide, nukleinske kiseline itd. (Zhang i sar., 2016).

Reakcije slobodnih radikala sa neradikalnim jedinjenjima (kao što su lipidi, proteini, nukleinske kiseline i ugljeni hidrati) mogu dovesti do formiranja slobodne radikalne lančane reakcije i stvaranja novih slobodnih radikala. Lipidna perkoxidacija i oksidacija proteina predstavljaju najozbiljnije posledice ovih reakcija (Betteridge 2000). Antioksidativni odbrambeni mehanizam uključuje celularne, membranske i estracelularne mehanizme. Celularni mehanizmi uključuju dizmutazu, peroksidazu i katalaza enzime. Membrane sa optimalnom koncentracijom holesterola i fosfolipida su izuzetno važne u odbrani od OS. Ekstracelularni mehanizmi uključuju metaloproteine

(transferin, laktoferin, i ceruloplazmin), koji održavaju metale u nereaktivnoj formi (Betteridge 2000).

Reaktivne vrste kiseonika učestvuju u regulaciji ćelijskog metabolizma delujući na fiziološke i patofiziološke procese i mere se pomoću proizvodnje slobodnih radikala i antioksidativnog balansa. Oksidativni stres se uglavnom određuje merenjem produkata oksidativnog oštećenja tkiva: lipidne peroksidacije, DNK oksidacije i proteinske oksidacije (Betteridge 2000). Reaktivne vrste kiseonika u ćelijama nastaju tokom procesa oksidativne fosforilacije u mitohondrijama ili tokom interakcije sa egzogenim izvorima, poput ksenobiotika. Glavni izvor endogenih ROS jesu mitohondrije (respiratorni lanac), ali mogu nastati i kao nusprodukt različitih enzimskih reakcija u citoplazmi, ćelijskoj membrani, endoplazmatskom retikulumu itd. Takođe, ROS mogu biti sintetisane od strane određenih enzima poput nikotinamida (NADPH) i ksantin oksidaze, i poseduju sposobnost da direktno učestvuju u signalnim putevima (Forrester i sar., 2018). Povišena aktivnost ksantin oksidaze generiše O_2^- i redukuje aktivnost superoksid dizmutaze (SOD) čime utiče na disfunkciju endotela (Feoli i sar., 2014). NADPH oksidaza predstavlja prooksidativni enzimski kompleks koji generiše vodonik peroksid i O_2^- i direktno utiče na transmembranske proteine (Cross i Segal 2004; Takaishi i Kinoshita 2021).

1.6.1 Fluoridi i oksidativni stres

Istraživanja na animalnim modelima su pokazala da subakutna izloženost povišenim koncentracijama F^- utiče na aktivnost antioksidativnih enzima i parametre redoks statusa, kao što su SOD (SOD1, SOD2 i SOD3), katalaza (CAT), glutation-peroksidaza (GPx.), glutation (GSH), 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) i malondialdehid (MDA) u bubrezima i jetri pacova (Adedara i sar., 2017; Luo i sar., 2017). Kod miševa izloženih F^- u koncentraciji od 100 ppm, uočena je povišena aktivnost NO i NO sintaze 2 (NOS2), kao i transaminaza jetre, poput alanin aminotransferaze, aspartat aminotransferaze, alkalne fosfataze i ukupnog bilirubina (Zhou i sar., 2015). Fluoridi indukuju OS i apoptozu hepatocita preko signalnog puta receptora tipa 1 za faktor nekroze tumora (TNF-R1) kod eksperimentalnog životinjskog modela, i negativno utiču na funkciju jetre (Lu i sar., 2017). Pojedini autori ističu da F^- utiču na smanjenje koncentracije cinka (Zn) i Cu u serumu eksperimentalnih miševa, a poznato je da su ovi bioelementi kofaktori SOD1 (Bouaziz i sar., 2007). Hronična ekspozicija F^- u koncentraciji od 50 mg/l dovodi do njihovog kumulovanja u jetri, kao i do promena aktivnosti ciklooksigenaza čime direktno dolazi do nastanka i razvitka inflamacije (Dec i sar., 2018). *In vitro*, F^- dovode do smanjenja imunološke funkcije slezine, redukujući B i T limfocite (Kuang i sar., 2016). Visoke koncentracije F^- dovode do apoptoze splenocita, OS, oštećenja mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma (Das i sar., 2006; Chen i sar., 2011). Kod novorođenih pacova čije su majke bile izložene F^- u koncentracijama od 50 i 150 ppm, uočena je neurotoksičnost, koja je smanjena pomoću različitih suplemenata-vitamina C i E, Zn i Se (Mahaboob Basha i Madhusudhan 2011). Ipak, pojedini autori ističu da kod pacova koji su bili izloženi F^- u niskim koncentracijama putem vode, nisu uočene promene u neurološkim motornim, senzornim i memorijskim parametrima (McPherson i sar., 2018). *In vitro* istraživanja su pokazala da povišene koncentracije F^- dovode do smanjene proliferacije Lejdigovih ćelija, kao i do nastanka OS (Aydin 2017). *In vivo*, F^- ispoljavaju toksične efekte na testise, epididimis, polne hormone i kvalitet spermatozoida kod mužjaka pacova (Zhao i sar., 2017). Pojedini autori su pokazali da se aktivnost antioksidativnih enzima u krvi ne menja kod ljudi i životinja koji su bili izloženi F^- u visokim koncentracijama (Reddy i sar., 2003). Ipak, drugi autori su pokazali da povišene koncentracije F^- utiču na povećanje nivoa tiobarbituratne kiseline i smanjenje koncentracije NO i aktivnosti CAT u prerifernoj krvi, ukazujući na njegov toksični potencijal (Miranda i sar., 2018).

1.7 Fluoridi i bioelementi

Zabeležena je interakcija između F⁻ i pojedinih bioelemenata poput cinka, kobalta, molibdena, hroma i mangana u urinu, serumu i pojedinim tkivima (Mazurek-Mochol 2002; Mou i sar., 2004; Karademir 2010). Rađene su analize seruma i urina (Tkachenko i sar., 2021), dok su podaci o uticaju visokih koncentracija F⁻ nakon subakutne ekspozicije na koncentraciju bioelemenata deficitni.

Bioelementi poput Zn, Cu, Fe, Mn i Se predstavljaju važne komponente ishrane ljudi i životinja (Nieder i sar., 2018). Gvožđe je biogeni prelazni element koji se u najvećoj meri (65%) nalazi u hemoglobinu (vezan za hem grupu) i učestvuje u detoksikaciji i transportu kiseonika kroz organizam (Wallace 2016). Cink je esencijalni prelazni element, sastavni je deo brojnih proteina, uključujući enzime, receptore, citokine i faktore transkripcije (Fukada i sar., 2011). Bakar je bioelement koji predstavlja kofaktor za brojne proteine i učestvuje u oksidativnoj respiraciji i transportu elektrona (Arguello i sar., 2013). Mangan učestvuje u brojnim fiziološkim procesima i važan je za funkcionisanje imunskog i endokrinog sistema, hematopoezu, i regulaciju OS (Katz i Rader 2019).

Bioelementi su neophodni za funkcionisanje organizma i njihov disbalans može dovesti do različitih oboljenja i poremećaja sistema organa (Li i sar., 2020). Bioelementi učestvuju u regulaciji transkripcije DNK molekula i predstavljaju kofaktore za brojne enzime. Takođe ispoljavaju antioksidativna svojstva i imaju sposobnost eliminacije produkata oksidacije (Shenkin 2006). Njihov značaj za oralno zdravlje je veliki, budući da ispoljavaju baktericidna svojstva i imaju uticaj na stvaranje oralnog biofilma. Takođe, Zn učestvuje u procesima remineralizacije i demineralizacije, dok Cu i Fe utiču na smanjenje incidence karijesa (Lynch i Duckworth 2020). Novija istraživanja ističu da su u serumu dece sa hroničnom fluorozom vrednosti Cu i Zn snižene a vrednosti Fe povišene (Tkachenko i sar., 2021). Poznato je da manjak Zn tokom perioda razvoja rezultira neadekvatnim rastom i disfunkcijom nervnog, skeletnog, gastrointestinalnog i imunskog sistema (Roohani i sar., 2013). Zatim, u drugoj epidemiološkoj studiji, u serumu dece koja žive na području endemske fluoroze, zabeležene su snižene vrednosti Zn, dok su vrednosti Cu povišene (Khandare i sar., 2018). Taloženje Cu ispoljava toksičnost preko indukcije OS i DNK oštećenja kao i redukcije proliferacije ćelija (Royer i Sharman 2021).

1.8 Genotoksičnost fluorida

Genotoksikologija proučava oštećenja, reparaciju i mutagenezu DNK ili hromozoma ćelija, koje mogu nastati spontano ili pod uticajem endogenog i/ili egzogenog agensa. Genotoksični agensi imaju sposobnost da dovedu do promena genoma, tačnije mogu dovesti do nastanka mutacija, delecija, amplifikacija (hromozomskih duplikacija) ili aneuploidija (abnormalan broj hromozoma) ukoliko ne dođe do reparacije oštećenja DNK molekula. Ukoliko deluju na somatske ćelije, genotoksični agensi mogu doprineti nastanku karcinogenih promena, dok u germinativnim ćelijama mogu dovesti do poremećaja fertiliteta i fekunditeta i/ili naslednih mutacija (Phillips i Arlt 2009; Kolarević 2014). Procena genotoksičnosti od velikog je značaja imajući u vidu da predstavlja procenu bezbednosti kako za ljude, tako i za životinje. U cilju razjašnjavanja mehanizama genotoksičnosti, razvijeni su brojni testovi, koji detektuju mutacije, oštećenja jednog ili oba DNK lanca, hromozomske aberacije, reparaciju DNK oštećenja itd. (Bolognesi i sar., 2013; Ribeiro i sar., 2017). Najčešće korišćene tehnike su: molekularna-PCR (engl. *Polymerase chain reaction*), fluorescentna-komet test (engl. *Comet assay*, alkalna i neutralna varijanta), mikronukleus test, FISH test (engl. *Bromodeoxyuridine-labelled DNA-comet fluorescence in situ hybridization*), TUNEL test (engl. *Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick-end labeling assay*), ELISA (engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*), imunohistohemijske metode, elektrohemijske itd. (Figuroa-González i Pérez-Plasencia 2017). Komet test ili elektroforeza pojedinačnih ćelija (engl. *Single-Cell Gel Electrophoresis* (SCGE)) predstavlja visoko senzitivna, brz, jednostavan i ekonomičan test za

detekciju DNK oštećenja bilo kog organa tj. ćelije (*in vivo* i *in vitro*) i ima široku primenu u oblastima genotoksičnosti, molekularne epidemiologije, ekogenotoksikologije, kao i u oblastima koje proučavaju DNK oštećenja i reparacije (Collins 2004). Singh i saradnici su opisali modifikovanu alkalnu verziju komet testa (pH>13) koja detektuje denaturaciju i migraciju DNK jednolančanih i dvolančanih prekida, kao i alkalno labilnih mesta (uključujući apurinsko/apirimidinsko mesto) (Singh i sar., 1988; Phillips i Arlt 2009). Oštećenja na lancima mogu biti reparirana, ili mogu dovesti do apoptoze i mutacija (OECD 2016).

Genotoksičnost F⁻ je potvrđena kroz mehanizme nastanka OS (Sun i sar., 2014), disfunkciju mitohondrija (Ribeiro i sar., 2017), kao i sposobnosti da izazovu oštećenje hromozoma i DNK ćelija animalnog modela (Tsunoda i sar., 2005; Podder i sar., 2011; Choubisa 2012; Manivannan i sar., 2013; Song i sar., 2017; Perera i sar., 2018; Wei i sar., 2019). Ipak, rezultati studija koji se tiču genotoksičnosti F⁻ su kontradiktorni. U jednoj studiji F⁻ nisu izazvali oštećenja u limfocitima miševa (Ribeiro i sar., 2006). Takođe, aktivnost antioksidativnih enzima kod kunića posle hronične ekspozicije F⁻ u koncentraciji od 150 mg/l je ostala nepromenjena, ukazujući da F⁻ nisu izazvali OS u crvenim krvnim zrnima (Reddy i sar., 2003). Suprotno, kod miševa, DNK oštećenje nakon ekspozicije F⁻ je potvrđeno u kosnoj srži, bubrezima i jetri (Manivannan i sar., 2013).

1.9 Selen

1.9.1 Fizičke i hemijske osobine selena

Selen je otkriven 1817. godine od strane švedskog hemičara Jöns Jacob Berzeliusa, nalazi se u grupi 16 periodnog sistema elemenata, redni broj 34, atomska masa 78,97 (NCBI 2021). U prirodi, elementarni Se je redak i uglavnom se nalazi u Zemljinoj kori, u sklopu pojedinih minerala kao što su sulfidne rude ili sa srebrom, Cu, niklom, olovom (ATSDR 2003). Najčešće koncentracija Se u prirodi iznosi 50–90 µg/kg, dok u zemljištu varira od 5 do 1 200 000 µg/kg, i veća je u vulkanskim područjima. Selen se u zemljištu može naći u četiri forme, zavisno od oksidativnog statusa: elementarni selen (Se⁰), selenid (Se⁻²), selenit (Se⁺⁴) i selenat (Se⁺⁶). U prirodi se može naći šest izotopa selena (maseni brojevi 74, 76, 77, 78, 80 i 82) (WHO 1987; WHO 2011).

Selen se uglavnom dobija kao sporedni proizvod elektrolitičkog prečišćavanja ruda Cu, i koristi se za proizvodnju različitih cevi, fotoćelija, stakla, električnih uređaja, antifungicidnih sredstava i suplemenata (Boyd 2011; WHO 2011). Selen (ukoliko je rastvorljiv u vodi) može da se redukuje u selenid, od kojih je najvažniji vodonik selenid, bezbojni gas neprijatnog mirisa koji je ujedno i izuzetno toksičan (Boyd 2011). Seleniti i selenati su rastvorljivi u vodi, dok elementarni selen i selenidi nisu. U vazduhu se Se nalazi kao vodonik selenid, dok se elementarni selen, seleniti i selenati nalaze u obliku čestica. U urbanim područjima, koncentracija Se varira od 0,1 do 10 ng/m³, dok u industrijskim područjima gde se vrši prerada Cu može dostići i više koncentracije (Zoller WH 1976). U vodi, koncentracija Se varira od 0,06 µg/l do 400 µg/l, dok su koncentracije u javnim vodovodima uglavnom niže, oko 10 µg/l (WHO 2011).

1.9.2 Metabolizam selena

Većina organskih i neorganskih jedinjenja Se iz hrane se apsorbuje preko gastrointestinalnog trakta (80-95%), najvećim delom u tankom crevu (Bopp i sar., 1982). Nakon apsorpcije, Se se transportuje do organa pomoću selenoproteina P, i najveću koncentraciju dostiže u jetri, slezini, bubrezima, i testisima (Brown i Burk 1973). Ekskrecija Se se odvija uglavnom preko urina, pluća i digestivnog trakta (ATSDR 2003). Metabolizam Se se odvija u tri pravca: do specifičnih selenoproteina i do nespecifičnih proteina. Specifični selenoproteini uključuju tireodoksin reduktazu, GPx, selenoprotein P i druge (WHO 2011).

Natrijum-selenit je neorganska forma selena. U prisustvu GSH, natrijum-selenit se redukuje do vodonik selenida i stvara superoksid radikale u reakciji sa kiseonikom, koji mogu inhibirati aktivnost transkripcionog faktora Sp1. Smanjenje aktivnosti transkripcionog Sp1 faktora dovodi do inhibicije androgenog receptora, usled čega mogu nastati apoptoza i inhibicija proliferacije tumorogenih ćelija (NCBI 2021). Oslobođeni Se iz natrijum-selenita nakon apsorpcije u gastrointestinalnom traktu dospeva do jetre, gde se odvija redukcija u selenid, koji sa cisteinom formira selenocistein (Drljačić 2013).

1.9.3 Značaj i uloga selena

Selen se smatra važnim bioelementom (Oldfield 2006), ugrađuje se u proteine pomoću amino kiseline selenocisteina i selenometionina i navedene amino-kiseline predstavljaju važne komponente različitih imunskih, ćelijskih, hormonskih i antioksidativnih mehanizama (Brown i Arthur 2001; Kryukov i sar., 2003; Boyd 2011). Selen se nalazi u sastavu enzima jodotironin dejodinaza i GPx, i predstavlja potentan antioksidans koji slobodne radikale pretvara u neaktivna jedinjenja (Drljačić 2013). Selen ima važnu ulogu u procesu ćelijske reparacije i deluje na tri načina: direktnom neutralizacijom slobodnih radikala, redukcijom peroksidaza i smanjenjem produkcije ROS (Flora i Mittal 2015).

Izloženost niskim koncentracijama Se je uglavnom preko hrane, vode i vazduha (ATSDR 2003). Selen se prirodno nalazi u mesu i morskoj ribi (0,3-0,5 mg/kg što ujedno predstavlja i najvišu koncentraciju selena u hrani), kao i pirinču i hlebu. Adekvatan unos Se je neophodan, s obzirom da njegov deficit može doprineti nastanku kardiovaskularnih oboljenja i slabljenju imunskog sistema, dok je prekomerni unos toksičan i dovodi do diskoloracije kože i neuroloških problema, čak i do smrti (Boyd 2011; WHO 2011). Preporučena doza za unos selena kod dece (uzrast 9-13 godina) iznosi 40 µg/dan, a kod starijih od 18 godina iznosi 55 µg/dan (EFSA 2014).

1.9.4 Fluoridi i selen

Istraživanja su pokazala da Se utiče na reparaciju DNK molekula, antioksidativni sistem, kao i da ispoljava antitumorogena svojstva (Fischer i sar., 2006; Letavayová i sar., 2006; Lu i Holmgren 2009). Zatim, Se ispoljava antagonistička svojstva u odnosu na izloženost povišenim koncentracijama F⁻, smanjujući njihovu koncentraciju u krvi, mekim i čvrstim tkivima (Feng i sar., 2012; Flora i Mittal 2015). Pojedini autori su pokazali da suplementacija Se pozitivno deluje na disbalans metaboličkih enzima i sprečava nastanak OS i apoptoze koje mogu izazvati F⁻ (Reddy i sar., 2009; Gao i sar., 2021). Osim toga, pokazano je da Se eliminiše i redukuje slobodne radikale nastale pod uticajem F⁻ u tkivu mozga eksperimentalnih pacova (Charitha i sar., 2018), kao i da utiče na smanjenje hepatotoksičnosti i nefrotoksičnosti (Yu i sar., 2006; Al-Harbi i sar., 2014).

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Široka rasprostranjenost fluorida u prirodi kao i njihova česta upotreba u svakodnevnom životu, dovode do toga da kumulativni efekat fluorida ima potencijal da izazove toksične efekte. Pretpostavljeno je da će tretman rastućim koncentracijama fluorida putem vode za piće nakon 28 dana izazvati oštećenja različitih organa kod *Wistar* pacova. Osim toga, pretpostavljeno je da će antioksidans selen antagonizovati oštećenja izazvana fluoridima.

Ciljevi istraživanja:

- ❖ Ispitivanje uticaja rastućih koncentracija fluorida na telesnu masu *Wistar* pacova i zapreminu konzumirane vode;
- ❖ Ispitivanje koncentracija fluorida u krvi, mekim i kalcifikovanim tkivima *Wistar* pacova;
- ❖ Ispitivanje uticaja rastućih koncentracija fluorida na histološku strukturu mekih i kalcifikovanih tkiva *Wistar* pacova;
- ❖ Ispitivanje uticaja rastućih koncentracija fluorida na parametre redoks statusa u krvi i mekim tkivima kod *Wistar* pacova;
- ❖ Ispitivanje uticaja rastućih koncentracija fluorida na distribuciju bioelemenata-cinka, bakra, gvožđa i mangana u krvi, mekim i kalcifikovanim tkivima *Wistar* pacova;
- ❖ Ispitivanje uticaja rastućih koncentracija fluorida na stepen oštećenja DNK molekula u krvi i mekim tkivima *Wistar* pacova;
- ❖ Ispitivanje dozne zavisnosti efekata fluorida;
- ❖ Ispitivanje korelacija između eksternih i internih doza fluorida;
- ❖ Ispitivanje uticaja selena na krv, meka i kalcifikovana tkiva *Wistar* pacova;
- ❖ Ispitivanje uticaja selena na oštećenja izazvana fluoridima-morfološke promene, oksidativni stres, oštećenje DNK i nivoe bioelemenata u ispitivanim tkivima.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Hemikalije i reagensi

Sve korišćene hemikalije i reagensi su bili analitičkog stepena čistoće i nabavljeni iz komercijalnih izvora: natrijum-fluorid (Kemika, Zagreb); natrijum-selenit (Fluka, Švajcarska); akridin oranž, etidijum bromid, etilen diamin tetra sirćetna kiselina (EDTA), dimetilsulfoksid, rastvor agaroze normalne tačke topljenja (NMP engl. *Normal Melting Point*), rastvor agaroze niske tačke topljenja (LMP engl. *Low Melting Point*), tripsin, tris (hidroximetil) aminometan, natrijum-hlorid, TritonX-100, perhlorna kiselina, srebro-nitrat, hematoksilin, eozin, formaldehid, mravlja kiselina, hemikalije za određivanje parametara redoks statusa i bioelemenata (*Sigma-Aldrich*, Sjedinjene Američke Države); goveđi serum i fosfatni pufer (PBS engl. *phosphate buffered saline*) (*PAA Laboratories GmbH*, Austrija); azotna kiselina, (*Fischer Scientific*, Sjedinjene Američke Države).

3.2 Eksperimentalni protokol

U okviru doktorske disertacije, za eksperiment je korišćeno 40 laboratorijskih pacova (*Rattus norvegicus*) *Wistar* soja muškog pola, starosti osam nedelja, telesne mase 140-190 g u periodu izvođenja eksperimenta, odgajanih na farmi za uzgoj eksperimentalnih životinja Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Tokom perioda aklimatizacije od sedam dana, životinje su čuvane u vivarijumu Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Tokom trajanja eksperimenta, pacovi (po pet nasumično izabranih životinja u jednom kavezu) su bili smešteni u kaveze od pleksiglasa sa poklopcem od čelične žice (dimenzija 425×266×185 mm, *Tecniplast*, Italija), i podlogom od piljevine. Dnevno-noćni ritam (12 sati svetla/12 sati mraka) je obezbeđivan pomoću veštačkog osvetljavanja. Temperatura prostorije bila je u proseku 22±2 °C, dok je relativna vlažnost vazduha iznosila 60-70%.

Sve životinje su imale slobodan pristup vodi i standardnoj laboratorijskoj ishrani sastava: 20% proteina, 8% celuloze, 13% vlage, 1% kalcijuma, 0,90% lizina, 0,75% metionina+cistina, 0,5% fosfora, 0,15-0,25% natrijuma, mešavine minerala (cink 100 mg/kg, gvožđe 100 mg/kg, magnezijum 30 mg/kg, bakar 20 mg/kg, jod 0,5 mg/kg, selen 0,1 mg/kg), mešavine vitamina (A 10000 IU/kg, D₃ 1600 IU/kg, E 25 mg/kg, B₁₂ 0,02 mg/kg), antioksidanata 100 mg/kg, svarljiva energija 11MJ/kg proizvođača „Veterinarski zavod Subotica“, Subotica, Srbija.

Primenjene procedure su odobrene od strane Etičkog odbora Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (No. 36/2) i Etičkog odbora Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (No. 323-07-11822/2018-05) 2019. godine i sprovedene su u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja Republike Srbije („Sl. Glasnik R. Srbije“, broj 41/09) i Pravilnikom o uslovima za upis u registar za ogleda na životinjama („Sl. Glasnik R. Srbije“, broj 41/10).

Eksperimentalne životinje su bile podeljene u osam grupa sa po pet pacova u grupi. Životinje su pojedinačno označene markerima različitih boja duž repa (zeleno, plavo, crveno, zeleno-crveno) ili nisu imale oznaku, zatim su im nasumičnim odabirom dodeljeni različiti brojevi. Pacovima su rastvori F⁻, Se i kombinacijom F⁻ i Se davani preko vode za piće tokom 28 dana, dok je kontrolna grupa pila vodu sa česme (Tabela 3). Rastvori su pripremani svakodnevno od osnovnog rastvora natrijum-fluorida (5000 mg/l) i osnovnog rastvora natrijum-selenita (150 mg/l) koji su čuvani u

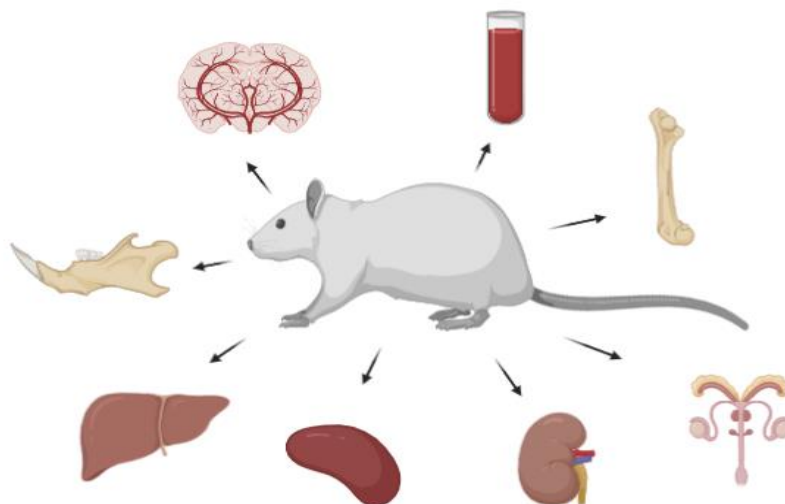
plastičnim bocama na hladnom u frižideru (4 °C). Ratvori su zatim sipani u pojilice za vodu, kojima su pacovi imali slobodan pristup.

Tokom trajanja eksperimenta, merena je t.m. životinja (prvi dan eksperimenta, nakon prve, druge, treće i četvrte nedelje), a unos vode i hrane po grupi svakodnevno. Prinos t.m. (PTM) je izračunat na osnovu sledeće formule: $(mk-mp)/mp$, pri čemu *mk* označava krajnju t.m. a *mi* početnu t.m. svake životinje. Krajnje t.m. su merene nakon sedmog, četrnaestog, dvadesetprvog i dvadesetosmog dana eksperimenta.

Tabela 3. Eksperimentalne grupe

<i>GRUPA</i>	<i>RASTVOR</i>
Kontrola	voda iz česme
F 10 ppm	10 mg/l natrijum-fluorid
F 25 ppm	25 mg/l natrijum-fluorid
F 50 ppm	50 mg/l natrijum-fluorid
F 100 ppm	100 mg/l natrijum-fluorid
F 150 ppm	150 mg/l natrijum-fluorid
F 150 ppm+Se	150 mg/l natrijum-fluorid +1,5 mg/l natrijum-selenit
Se	1,5 mg/l natrijum-selenit

Nakon 28 dana (subakutna toksičnost), eksperimentalne životinje su eutanazirane u skladu sa etičkim načelima, intraperitonealnom aplikacijom ketamina (100 mg/ml) i mišićnog relaksansa ksilazina (20 mg/ml) u dozi od 300 mg/kg ketamina i 30 mg/kg ksilazina. Nakon eutanazije, krv je sakupljena direktnom intrakardijalnom punkcijom pomoću špriceva od 3 ml (21G igla) i odmah prebacivana u vakutajnere sa antikoagulansom heparinom a zatim su izolovani jetra, slezina, bubrezi, mozak, testisi, zubi i femur (Slika 3).



Slika 3. Eksperimentalni protokol-uzorci tkiva pacova nakon žrtvovanja (krv, jetra, bubrezi, slezina, mozak, testisi, zubi i femur). Slika je nacrtana uz pomoć sajta BioRender.com (2020).

Jetra, bubrezi, slezina, mozak i testisi pacova su isprani fiziološkim rastvorom te podeljeni na delove za dalje analize. Sekutići, molari i femur (levi) su ekstrahovani specijalnim klještim za ekstrakciju, a potom su očišćeni od mekotkivnih struktura i isprani fiziološkim rastvorom.

3.2.1 Postupak pripreme krvi pacova

Za određivanje parametara redoks statusa, korišćena je krvna plazma koja je izolovana na sledeći način: nakon sakupljanja u vakutajnere sa heparinom, krv je centrifugirana 15 minuta na 3000rpm. Dobijeni supernatant je prebačen u ependorf tube zapremine 2 ml i odmah zamrzavan u tečnom azotu. Za potrebe analize parametara redoks statusa, uzorci plazme su čuvani u zamrzivaču na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Za određivanje koncentracija bioelemenata, korišćena je puna krv. Nakon sakupljanja u vakutajnere sa heparinom, krv je čuvana u zamrzivaču na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Za određivanje stepena genotoksičnosti, uzorci krvi su sakupljeni u vakutajnere sa heparinom, odakle je 50 μl krvi rastvoreno u 1 ml 20x hladnog 1xPBS-a, nakon čega su uzorci čuvani na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ u frižideru do daljih analiza.

3.2.2 Postupak pripreme tkiva pacova

Jetra, slezina i mozak su podeljeni skalpelom na pet delova radi sledećih analiza: određivanje koncentracija F^{-} , bioelemenata, parametara redoks statusa, genotoksičnosti i histoloških analiza. Bubrezi su podeljeni skalpelom na 4 dela radi sledećih analiza: određivanje koncentracija F^{-} , bioelemenata, parametara redoks statusa, i histoloških analiza. Testisi su podeljeni skalpelom na 4 dela za potrebe daljih analiza: određivanje koncentracija F^{-} , bioelemenata, parametara redoks statusa, i genotoksičnosti. Sekutići, molari i levi femur su izolovani pomoću odgovarajućih klješta i podeljeni na 3 dela za određivanje koncentracija F^{-} , bioelemenata i histoloških analiza.

Radi određivanja koncentracija F^{-} i bioelemenata, uzorci tkiva su čuvani u zamrzivaču na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljih analiza, dok su zarad određivanja parametara redoks statusa tkiva stavljena u tečni azot i čuvana na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljih analiza. Radi određivanja stepena genotoksičnosti, tkiva su stavljena u posude za uzorkovanje sa 5 ml hladnog 1xPBS-a i čuvana na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ u frižideru do daljih analiza. Fragmenti organa za potrebe histoloških analiza su fiksirani u 4% neutralno puferisanom (0,1M fosfatni pufer (pH 7,4)) formaldehidu tokom 48 sati.

3.3 Određivanje koncentracije fluorida u tkivima

Koncentracije F^{-} u tkivima jetre, bubrega, slezine, mozga, testisa, zuba i femura su određene pomoću jon selektivne elektrode za fluoride (WTW, ISE type 800—Consort, Belgija; pH-metar Iskra MA 5735) elektrohemijski, nakon mikrodifuzije (Nedeljković i sar., 1991). Određivanje koncentracije F^{-} na osnovu izmerenog potencijala vršeno je preko kalibracione krive koja opisuje zavisnost potencijala elektrode od koncentracije F^{-} .

Dodatkom 0,5 ml 1 mol/l natrijum-hidroksida u etanolu u poklopce difuzionih ćelija i sušenjem u sušnici (FK SAUTER SA, Bale, Švajcarska) na temperaturi od $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom 2 sata, na poklopcima je stvoren tanak sloj sasušenog natrijum-hidroksida. Za potrebe sušenja filma natrijum-hidroksida korišćena je sušnica. Sva tkiva (prosečne mase od 2 g do 3 g) su potom postavljena u difuzione ćelije a zatim je dodato 1,5 ml 40% srebro-perhlorata (22,5 g srebro-oksida je rastvoreno u 100 ml 60% perhlorne kiseline) i 1,5 ml 70% perhlorne kiseline, nakon čega su difuzione ćelije zatvorene poklopcima na kojima se nalazi film natrijum-hidroksida. Proces mikrodifuzije se odvijao na $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom 24 sata, pri čemu su oslobođeni F^{-} (pod dejstvom 70% perhlorne kiseline i srebro-perhlorata), reagovali sa natrijum-hidroksidom, i došlo je do formiranja natrijum-fluorida. Sadržaj

poklopca difuzione ćelije je kvantitativno prenošen sa 5ml destilovane vode u polietilenski sud gde je dodato 5 ml TISAB pufera (engl. *Total ionic strength adjustment buffer*, pH 5,5-6,0) u odnosu 1:1. TISAB je dodat radi regulisanja jonske jačine rastvora i otklanjanja uticaja drugih jedinjenja. TISAB je pripremljen od 57 ml glacijalne sirćetne kiseline, 58 g natrijum-hlorida, 300 mg natrijum-citrata i vode do 500 ml. Rastvor je zatim neutralizovan (pH 5-5,5) sa 5 mol/l natrijum-hidroksida u vodenom kupatilu. U pufer je zatim dodavana voda, do zapremine od 1l.

3.3.1 Određivanje potencijala fluoridnih jona

Potencijal fluoridnih jona meren je jon selektivnom elektrodom za F^- , pomoću formule:

$$E = - \log [F^-]$$

Rastvori za izradu kalibracione krive: osnovni (STOCK) rastvor (0,1mol/l F^-) od koga je napravljen radni rastvor (10 mmol/l F^-) tako što je 5 ml STOCK rastvora dopunjeno do 50 ml vodom. Zatim je napravljeno pet mernih standardnih rastvora fluorida: 6,25 $\mu\text{mol/l } F^-$ (31,25 μl radnog rastvora je dopunjeno do 50 ml vodom), 12,5 $\mu\text{mol/l } F^-$ (62,5 μl radnog rastvora je dopunjeno do 50 ml vodom); 25 $\mu\text{mol/l } F^-$ (0,125 ml radnog rastvora je dopunjeno do 50 ml vodom), 50 $\mu\text{mol/l } F^-$ (0,25 ml radnog rastvora je dopunjeno do 50 ml vodom), 100 $\mu\text{mol/l } F^-$ (0,5 ml radnog rastvora je dopunjeno do 50 ml vodom) i 200 $\mu\text{mol/l } F^-$ (1,0 ml radnog rastvora je dopunjeno do 50 ml vodom).

Izrada kalibracione krive:

U polietilenskoj posudi, standardni rastvori natrijum hidroksida se razblažuju puferom TISAB pH 5-5,5 u odnosu 1:1 (10 ml standardnog rastvora F^- i 10 ml TISAB pufera). Na pH-metru se podešava sobna temperatura i očitava potencijal (mV) posle tri minuta. Potencijal se očitava svakog sledećeg minuta do konstantnog potencijala, uz mešanje magnetnom mešalicom. Registrovani potencijali se koriste za izradu kalibracione krive na semilogaritamskom papiru. Na X osi se unosi vrednost potencijala (mV), dok se na Y osi unosi koncentracija fluorida ($\mu\text{mol/l}$). Zavisnost potencijala od logaritma koncentracije F^- jona predstavljena je regresionom jednačinom:

$E = -46,507 * \log C + 113,51$. Limit kvantifikacije metode bio je 0,0015 mg/kg, a limit detekcije 0,0005 mg/kg F^- .

3.4 Histološka i histomorfometrijska analiza

Za histološku i histomorfometrijsku analizu, korišćeni su preseci jetre, bubrega, slezine, mozga, zuba i femura. Fragmenti organa su fiksirani u 4% neutralno puferisanom (0,1M fosfatni pufer (pH 7,4)) formaldehidu tokom 48 sati, dok su uzorci zuba i femura su dekalcifikovani pomoću mravlje kiseline. Sva tkiva su isprana destilovanom vodom i potom postepeno, u fazama, dehidratirana u alkoholnim rastvorima rastućih koncentracija (od 70 do 100% etanola). Nakon dehidracije, uzorci su ukalupljeni u paraplastu. Kalupi tkiva su sečeni na uzdužne preseke tkiva debljine 4 μm , rotirajućim mikrotomom (*Leica SM2000R, Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka*). Tkiva su potom očišćena od voska, potapanjem u ksilene. Isečci tkiva su učvršćivani na mikroskopska stakla presvučena silicijumom i bojena hematoksilinom i eozinom. Ovako pripremljeni isečci tkiva analizirani su na mikroskopu (*Leitz Labor LuxS Fluorescence Microscope, Ernst Leitz Wetzlar GMBH, Nemačka*), korišćenjem različitih uveličanja (40x-400x). 2D slike su zabeležene i analizirane pomoću digitalne kamere u boji (*Leica DFC295, Nemačka*) i računarskog programa (*Leica University Suite, version 4.3, Leica Microsystems, Nemačka*), na uveličanjima 40x, 100x i 400x.

Histološka i histomorfometrijska analiza jetre je kategorizovana pomoću histološkog indeksa aktivnosti (HAI engl. *Knodell Score*). HAI indeks je modifikovana polu kvantitativna metoda kojom se boduje uzorak tkiva jetre (Knodell i sar., 1981; Perera i sar., 2018). Bodovanje je zasnovano na detekciji portalne/periportalne aktivnosti, sa ili bez *bridžing* nekroze, intralobularne nekroze, portalne inflamacije i fibroze. Urađeno je bodovanje za periportalnu/*bridžing* nekrozu (0-10), intralobularnu

degeneraciju (0-4), portalnu inflamaciju (0-4) i fibrozu (0-4), radi dobijanja vrednosti HAI indeksa (0-22).

Fibroza

0 - Bez fibroze

1 - Fibrozna portalna ekspanzija

3 - Bridžing fibroza

4 - Ciroza

Portalna inflamacija

0 - Bez inflamacije

1 - Minimalna (mala količina inflamatornih ćelija prisutnih u manjoj površini od 1/3 portalnog trakta)

3 - Umerena (povećan broj inflamatornih ćelija prisutnih u između 1/3 i 2/3 površine portalnog trakta)

4 - Izražena (gusto upakovane inflamatorne ćelije rasprostranjene u više od 2/3 površine portalnog trakta)

Intralobularna degeneracija i fokalna nekroza

0 - Bez nekroze

1 - Minimalna (acidofilna tela, balonirana degeneracija, i/ili raštrkana žarišta hepatocelularne nekroze prisutna u manje od 1/3 lobusa, piknoza nukleusa, arterijska dilatacija)

3 - Umerena (nekroza zahvata od 1/3 do 2/3 lobusa)

4 - Izražena (nekrozom je zahvaćeno više od 2/3 lobusa)

Periportalna i bridžing nekroza

0 - Bez nekroze

1 - Minimalna periportalna nekroza

3 - Umerena periportalna nekroza (zahvata <50% portalnih traktova)

4 - Izražena periportalna nekroza (zahvata > 50% portalnih traktova)

5 - Umerena periportalna nekroza+bridžing nekroza

6 - Izražena periportalna nekroza+bridžing nekroza

10 - Multilobularna nekroza

Interpretacija rezultata

0 - Nema inflamacije

1- 4 Minimalna inflamacija

5 - 8 Blaga inflamacija

9 - 12 Umerena inflamacija

13 - 22 Izražena inflamacija

3.5 Određivanje redoks statusa u plazmi i tkivima

U okviru eksperimenta, određeni su sledeći biomarkeri redoks statusa: prooksidativni biomarkeri: $O_2^{\cdot-}$ i totalni oksidativni status (TOS); enzimski i neenzimski antioksidativni biomarkeri-aktivnost SOD1, ukupne sulfhidrilne grupe (SH) i totalni antioksidativni status (TAS). Dodatno, kao mera oksidativnog oštećenja tkiva određeni su MDA, kao proizvod procesa lipidne peroksidacije, i uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP engl. *advanced oxidation protein products*). Za analizu su korišćeni reagensi analitičkog stepena čistoće iz komercijalnih izvora. Spektrofotometrijske metode za određivanje $O_2^{\cdot-}$, TAS, TOS, SOD, i AOPP su prilagođene i

implementirane na analizatoru ILAB 300 *Plus analyzer* (*Instrumentation Laboratory*, Milano, Italija) (Kotur-Stevuljevic i sar., 2008). Spektrofotometrijsko merenje nivoa MDA i SH grupa izvedeno je na spektrofotometru SPECTROstar Nano UV/VIS (*BMG Labtech*, Ortenberg, Nemačka).

3.5.1 Priprema homogenata tkiva

Nakon odmrzavanja, brzim postupkom na ledu (0-4 °C), priprema tkiva jetre, bubrega, slezine, mozga i testisa urađena je homogenizacijom uzorka (0,2-0,4 g), u hladnom fosfatnom puferu (0,1 mol/l, pH 7,4, koji sadrži 1,15% kalijum-hlorid) u odnosu 1:9 (v/v), u staklenoj epruveti na 1000 obrtaja/min. Korišćen je homogenizator T10 basic *ULTRA-TURRAX* (IKA, *Königswinter*, Nemačka) (Pawa i Ali 2004). Homogenat je centrifugiran (*Centrifuge 5415 R*, *Eppendorf*, Hamburg, Nemačka) na +4 °C u dve faze: prvo na 800xg tokom 10 minuta, a zatim na 9500xg tokom 20 minuta, radi dobijanja postmitohondrijalnog supernatanta. Za određivanje biomarkera redoks statusa korišćen je postmitohondrijalni supernatant koji je odvajan u ependorf tubice zapremine 2 ml i čuvan na -80 °C do daljih analiza.

3.5.2 Određivanje koncentracije proteina u homogenatima tkiva

Koncentracija proteina u tkivima eksperimentalnih životinja je urađena po spektrofotometrijskoj metodi (Bradford 1976), pri čemu je kao standard korišćen goveđi serumski albumin (*Sigma-Aldrich*, ≥98%). Ova metoda se zasniva na vezivanju *Coomassie Brilliant Blue G-250* boje za molekul proteina u uzorku, pri čemu dolazi do promene apsorbcionog maksimuma sa 465 na 595 nm. Merenjem apsorbance formiranog produkta reakcije, određivana je koncentracija totalnih proteina u uzorku. Intenzitet boje je proporcionalan koncentraciji ukupnih proteina i izražavan je u gramima.

3.5.3. Određivanje biomarkera redoks statusa

3.5.3.1 Određivanje koncentracije superoksidnog anjona

Određivanje $O_2^{\cdot -}$ je urađeno pomoću metode u kojoj $O_2^{\cdot -}$ redukuje žutu nitro grupu nitroblu-tetrazolijuma (NBT) do monoformazana (nepotpuna redukcija) i diformazana (potpuna redukcija) (Auclair i Voisin 1988). Plavi diformazan je nerastvorljiv u vodi, i zbog toga se dodaje želatin (0,1 mg/ml). Reakciji potpune redukcije NBT-a kompetira spontana dismutacija kiseonika. Zbog toga je neophodna inhibicija pritiska kiseonika u medijumu (0,05 M fosfatni pufer pH 8,6 uz 0,1 mM EDTA) pomoću izlaganja NBT reagensa azotu pod pritiskom, u periodu od jednog sata. Stvaranje $O_2^{\cdot -}$ se meri na spektrofotometru (550 nm), i predstavlja brzinu promene žute boje NBT-a u plavi formazan. Brzina redukcije NBT se određuje pomoću molarnog ekstinkcionog koeficijenta monoformazana. Koncentracija $O_2^{\cdot -}$ se izražava u μmol redukovanog NBT/min po gramu proteina ili po litru.

3.5.3.2 Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost SOD1 je merena po metodi koja se zasniva na sposobnosti enzima da inhibira autooksidaciju adrenalina u baznoj sredini (pH 10,2) na 25 °C (Misra i Fridovich 1972). Aktivnost SOD1 je određena merenjem apsorbance proizvoda oksidacije adrenalina crvene boje na 480 nm na 25 °C, sa (uzorak) i bez prisustva (kontrola) SOD1. Jedinica aktivnosti SOD1 (U) predstavlja aktivnost enzima koji dovodi do 50% inhibicije autooksidacije adrenalina, i dobija se merenjem absorbance na 480 nm. Rastvor adrenalina (10 mM u 15 mM hlorovodonične kiseline) je razblaživan

sa 15 mM hlorovodonične kiseline do koncentracije koja je u kontroli dovela do promene apsorbance 0,025 U/min, pošto SOD1 tada postiže maksimalni procenat inhibicije autooksidacije adrenalina. Aktivnost SOD1 predstavlja procenat inhibicije autooksidacije adrenalina.

3.5.3.3 Određivanje koncentracije malondialdehida

Određivanje koncentracije MDA je rađeno po metodi koja se zasniva na reakciji krajnjih proizvoda lipidne peroksidacije, poput MDA sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) i stvaranju obojenog, crvenog kompleksa (Girotti i sar., 1991). Postupak je izvođen tako što je u uzorke dodavan TBA reagens (0,375% tiobarbiturna kiselina, 15% trihlorsirćenta kiselina i 0,25 M hlorovodonična kiselina), te je smeša inkubirana na 100 °C, 5 minuta i ohlađena na ledu. Nakon hlađenja, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 10 000xg, na +4 °C. Rezultati su očitani na spektrofotometru, na apsorbanci 535 nm. Koncentracija MDA je izražavana u μmol po gramu proteina ili po litru.

3.5.3.4 Određivanje totalnog oksidativnog statusa

Vrednosti TOS su određene spektrofotometrijskom metodom koja se zasniva na kapacitetu ukupnih oksidanata (poput lipidnih hidroperoksida i vodonik peroksida) da oksidiraju fero jon-ortodiazinidin kompleks u feri jon, a feri jon formira obojeni kompleks sa ksilenol-oranžom u kiseljoj sredini (Erel 2005). Intenzitet boje se meri spektrofotometrijski, na 560 nm i proporcionalan je ukupnoj količini oksidanata koji se nalaze u uzorku. Tokom postupka određivanja TOS korišćena su dva reagensa: reagens 1 (150 μM ksilenol-oranž i 140 mM natrijum-hlorida i 1,35 M glicerola (pH 1,75)) koji je olakšao reakciju oksidacije i reagens 2 (5 mM feroamonijum sulfata i 10 mM o-diazinidin dihidrohlorida). Rezultati su izraženi u $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv. po gramu proteina ili po litru, dok je za izradu standardne krive korišćen vodonik peroksid koncentracije od 10 do 200 μM .

3.5.3.5 Određivanje totalnog antioksidativnog statusa

Vrednosti TAS su određene spektrofotometrijskom metodom koja se zasniva na oksidaciji 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolidin)-6-sulfonat (ABTS) do obojenog $\text{ABTS}^{\cdot+}$ pomoću 2 mM vodonik peroksida u kiseljoj sredini (pH 3,6, acetatni puffer 30 mM) (Erel 2004). Navedeni rastvor se zatim rastvara pomoću koncentrovanijeg acetatnog pufera (0,4 mol/l, pH 5,8), čime se postepeno smanjuje intenzitet boje. Antioksidatni u uzorku redukuju obojeni $\text{ABTS}^{\cdot+}$ do bezbojnog, dok je intenzitet boje obrnuto srazmeran koncentracijama ukupnih antioksidanasa. Za kalibraciju je korišćen Trolox (hidrosolubilni analog vitamina E), koji je rastvoren u fosfatnom puferu (pH 7,4). Apsorbanca je očitana na 660 nm, dok su rezultati izraženi u $\mu\text{mol Trolox. Equiv.}$ po gramu proteina ili po litru.

3.5.3.6 Određivanje ukupnih sulfhidrilnih grupa

Koncentracije SH grupa su određene metodom koja se zasniva na reakciji 2-nitrobenzoeve kiseline (DTNB) u alkalnoj sredini (pH 8,0) sa alifatičnim tiolima, nakon čega nastaje žuto-obojeni p-nitrofenol (Ellman 1959). Apsorbanca se očitava na 412 nm, dok se rezultati izražavaju kao mmol po gramu proteina ili po litru.

3.5.3.7 Određivanje uznapredovalih proizvoda oksidacije proteina

Koncentracija AOPP je određivana pomoću metode koju se opisali Witko-Sarsat i sar. (1996), koristeći glacijalnu sirćetnu kiselinu (20 μl), kalijum jodid (1,16 mol/l) i fosfatni pufer (pH 7,4, 20

mM). Produkti oksidacije proteina formiraju narandžaste produkte. Apsorbanca je merena na 340 nm. Za izradu standardne krive je korišćen hloramin T (10-100 $\mu\text{mol/l}$). Vrednosti AOPP su izraženi u μmol ekvivalenta Hloramina T po gramu proteina ili litru.

3.6 Određivanje koncentracije bioelemenata

Koncentracije bioelementa: Cu, Zn, Fe i Mn su određivane u punoj krvi i tkivima jetre, bubrega, slezine, mozga, testisa, zuba i femura. Pre početka analiza, stakleno posuđe za uzorke je potapano u 10% azotnoj kiselini, nakon čega je ispirano destilovanom i dejonizovanom vodom. Uzorci tkiva i pune krvi su odmereni na analitičkoj vagi (*Radwag*, Poljska), nakon čega su u uzorke pomoću pipeta dodavane koncentrovane mineralne kiseline za digestiju-8 ml 69% azotne kiseline i 2 ml 71 % perhlorne kiseline, radi mineralizacije uzoraka. Uzorci su zatim postavljeni na peščano kupatilo (Elektron, Srbija) na 200 °C i uparavani do suva. Nakon završenog procesa razaranja, uzorci su dopunjeni sa 0,3% azotne kiseline do 25 ml u normalnim sudovima, radi potpunog rastvaranja suvog ostatka. Analiza koncentracija Cu, Zn, Mn, i Fe je urađena na plamenom atomskom apsorpcionom spektrometru (FAAS, 240FS AA, *Agilent Technologies Santa Clara*, Sjedinjene Američke Države). Kalibracione krive su izrađene pomoću standardnih kalibracionih rastvora (ICM-100, *Agilent Technologies Santa Clara*, Sjedinjene Američke Države) pravljenjem radnih standardnih rastvora u rastućim koncentracijama: 0,10 mg/l, 0,20 mg/l, 0,50 mg/l, 1,00 mg/l, 5,00 mg/l i 10,00 mg. Apsorpcija je očitana na 324,8 nm za Cu; 248,3 nm za Fe; 279,5 nm za Mn i 213,9 nm za Zn. Koncentracije bioelemenata su izražene u $\mu\text{g/g}$ za tkiva i u $\mu\text{mol/l}$ i mmol/l za krv.

3.7 Komet test

Komet test predstavlja jedan od najčešće korišćenih testova za detekciju DNK oštećenja u eukariotskim ćelijama. Prve verzije komet testa datiraju još iz 80-ih godina (Ostling i Johanson 1984), da bi se kasnije razvile alkalna (najzastupljenija) (Singh i sar., 1988; Collins i Dusinská 2002) i neutralna varijanta komet testa (Collins i Dusinská 2002). Komet test ima veliki značaj u posmatranju delovanja različitih toksina na prirodu, biljke, životinje i ljude, koristi se za procenu genotoksičnosti novih hemikalija, kao i za detekciju DNK oštećenja i reparacije (Collins 2004; Langie i sar., 2015).

3.7.1 Priprema ćelijske suspenzije

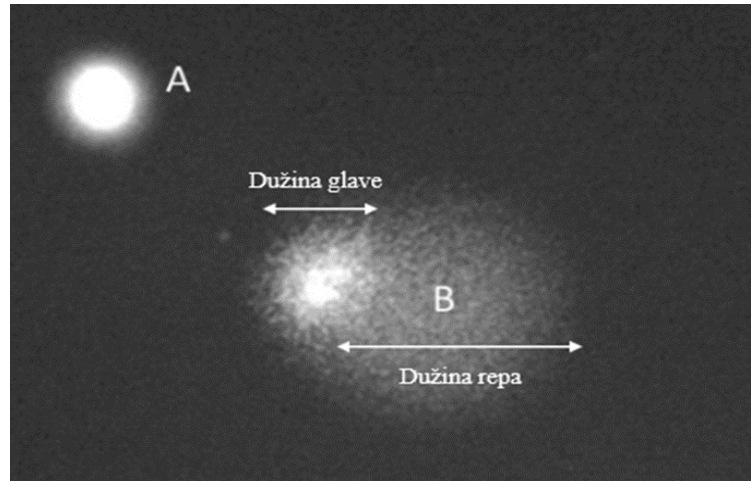
Komet test je urađen na uzorcima krvi, jetre, slezine, mozga i testisa. Uzorci tkiva (veličine 5x5 mm) su isprani hladnim fiziološkim rastvorom (natrijum-hlorid 0,9%) i odlagani u plastične posude za uzorkovanje u koje je prethodno razliveno 20 ml 1xPBS-a i potom su stavljeni na 4 °C u frižider. Sat vremena nakon žrtvovanja eksperimentalnih životinja, započet je komet test. Suspenzije ćelija su pripremljene po modifikovanom protokolu Kostić i sar. (2016). Približno 300 mg tkiva jetre, slezine, mozga, i testisa je macerirano skalpelom u 1ml hladnog 1xPBS-a. U svaki uzorak je dodato 50 μl 0,1% tripsin-EDTA rastvora, a zatim su uzorci stavljeni u šejker na 23 °C na 10 minuta. Zatim je dodato 100 μl goveđeg seruma, i uzorci su ostavljeni da odstoje nekoliko minuta. Iz supernatanta je uzeto 800 μl ćelijske suspenzije i centrifugirano 5 minuta na 1500rpm. Gornja faza se dekantuje, a talog se resuspenduje u hladnom 1xPBS-u tako da broj ćelija bude $10^5/\text{ml}$. Ćelijska vijabilnost svakog tkiva je proverena pomoću akridin oranž/etidijum bromid bojenja. Zatim, 2 μl pripremljene akridin oranž/etidijum bromid boje se dodaje u 20 μl suspenzije ćelija. Suspenzija se zatim nanosi na mikroskopsku pločicu i prekriva se pokrovnim stakalcem. Ćelije se posmatraju na mikroskopu sa fluorescencijom (*Leica*, DMLS, Austrija), pod uvećanjem 200 \times , sa filterom za ekscitaciju (pobuđivanje) od 510-560 nm i emisiju od 590 nm. Ukoliko je membrana ćelije intaktna, akridin oranž boja će difundovati u ćeliju i jedro obojiti zelenom fluorescencijom. Ukoliko je membrana

oštećena, pored akridin oranž boje, i etidijum bromid će difundovati u ćeliju i prekriti signal. Samim tim, jedra će emitovati crvenu fluorescenciju. Ćelije sa crvenim jedrom se smatraju mrtvim, dok se ćelije sa zelenim jedrom smatraju živim (Squier i Cohen 2001).

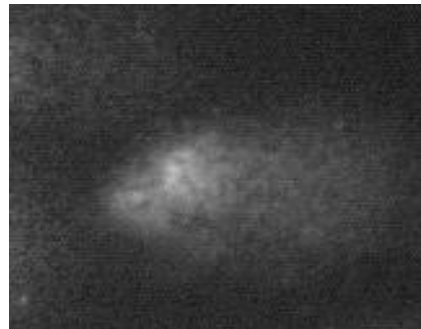
3.7.2 Komet test

Primenjena je minigel verzija komet testa, po protokolu Azqueta i sar. (2013) sa modifikacijama. Očišćene i odmašćene mikroskopske pločice se potapaju u 1% rastvor NMP agaroze i suše na sobnoj temperaturi 24 sata. Od pripremljene ćelijske suspenzije, 30 μ l je izmešano sa 70 μ l 1% LMP agaroze. Iz te smeše, 15 μ l za svako tkivo je stavljeno na mikroskopske pločice prethodno presvućene agarozom, i ostavljeno 5 minuta na 4 °C, kako bi se agarozna stegla. Zatim je primenjen sledeći protokol (Kolarević i sar., 2016): mikroskopske pločice su lizirane 24 sata u sveže pripremljenom i ohlađenom (na 4 °C) lizirajućem puferu (2,5 M natrijum-hlorid, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% dimetil sulfoksid, 1,5% Triton X-100, pH 10), a potom poređane u kadicu za elektroforezu i potopljene u hladni (4 °C) alkalni pufer za elektroforezu (300 mM natrijum hidroksid, 1 mM EDTA, pH 13), gde su inkubirane u periodu od 20 minuta na 4 °C, bez struje da bi došlo do denaturacije DNK. Nakon denaturacije, vršena je elektroforeza (0,75 V/cm, 300 mA) u istom rastvoru, narednih 20 minuta. Potom su mikroskopske pločice potapane u hladan (4 °C) rastvor za neutralizaciju (0,4 M Tris, pH 7,5) na 15 minuta, te je fiksacija pločica vršena u hladnom metanolu (4 °C) 15 minuta. Pločice su zatim sušene 24 sata na vazduhu i sobnoj temperaturi. Eksperiment je rađen u triplicatu, A, B i C za svako tkivo. Dva gela (A i B) su pripremljena na odvojenim pločicama. C pločice su korišćene kao rezerva, u slučaju da je na pločicama A ili B došlo do oštećenja gela. Neposredno pre analize, pločice se potapaju u hladnu destilovanu vodu 15 minuta kako bi se agarozna rehidrirala. Za bojenje mikroskopskih pločica se koristi akridin oranž (2 μ g/ml). Na svaki gel se nanese po 20 μ l rastvora boje i pokrije pokrovnim staklom.

Tokom elektroforeze, nefragmentisani segmenti DNK molekula ostaju fiksirani, dok negativno naelektrisani fragmenti DNK se kreću kroz agarozu ka pozitivnoj elektrodi (Kolarević 2014; OECD 2016). Komete se nakon fluorescentnog bojenja mogu analizirati manuelno ili pomoću različitih računarskih softvera (Phillips i Arlt 2009). U okviru ove studije za analizu pločica (15 uzoraka na jednoj pločici), korišćen program je *Comet IV Computer Software (Perceptive Instruments, Velika Britanija)* koji automatski detektuje nivo DNK oštećenja. Na svakoj pločici se analizira uzorak svakog tkiva od 100 kometa, uz pomoć fluorescentnog mikroskopa (*Leica, DMLS, Austrija*), pod uveličanjem 400 \times , i filterom za ekscitaciju 510–560 nm i emisiju 590 nm. Jedra koja imaju oštećenje DNK molekula formiraju oblik komete, usled migracije DNK hromozoma iz samog jedra dok su neoštećena kružnog oblika (Slika 4) (Igl 2018). Ovaj softver za analizu stepena DNK oštećenja koristi tri parametra: moment repa (engl. *Olive Tail Moment* (intenzitet repa \times dužina repa), intenzitet repa (engl. *Tail Intensity* (% ukupne DNA)), i dužina repa komete (engl. *Tail Length* (μ m)) (Olive i Banáth 2006). Intenzitet repa komete predstavlja parameter koji se najčešće koristi za statističke analize, i ovaj parameter je analiziran u našoj studiji (Burlinson i sar., 2007). Teoretski, intenzitet repa komete može imati vrednosti od 0% do 100%. Što je veći procenat, veće je DNK oštećenje. Ipak, ukoliko je intenzitet repa veći od 85%, takva jedra nazivamo izuzetno oštećena jedra (IOJ engl. *Hedgehogs*) (Slika 5) i isključujemo ih iz daljih analiza (Bright et. al, 2011). Izuzetno oštećena jedra predstavljaju veoma oštećene ćelije, koje su apoptotične i koje dokumentujemo odvojeno (više od 10 IOJ na pločici može ukazati na oštećenje preparata). Prilikom analize pločica, izbegava se analiza ćelija koje se nalaze na ivici preparata (Igl 2018). Tokom vizualizacije ćelija pomoću fluorescentne mikroskopije, kamera detektuje intenzitet svetlosti koju emituje svaka kometa i pretvara u električne signale, koje kompjuter dalje dekodira i prikazuje kao sliku na ekranu. Zatim se detektuju glava i rep komete. Intenzitet svetlosti koju emituju glava i rep komete se koristi za izračunavanje različitih parametara komet testa (Kumaravel i sar., 2009). Smatra se da je kvantitet indukovanog DNK oštećenja srazmeran indikator za genotoksični potencijal određene supstance (Møller i sar., 2000; Collins 2004).



Slika 4. Softverski prikaz mikroskopske pločice (*Comet IV Computer Software*) ćelije slezine Wistar pacova iz grupe koja je pila vodu sa 100 mg/l fluorida. A-neoštećeno jezro; B-oštećeno jezro (kometa).



Slika 5. Softverski prikaz mikroskopske pločice (*Comet IV Computer Software*). Izuzetno oštećeno jezro ćelije jetre Wistar pacova iz grupe koja je pila vodu sa 150 mg/l fluorida.

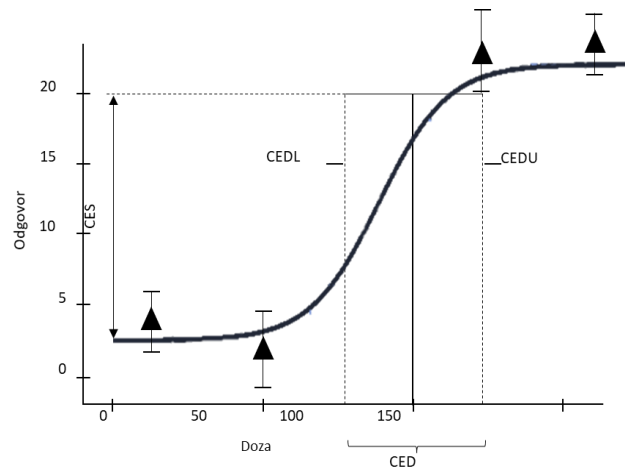
3.8 Statistička analiza

Statističke analize i grafički prikazi za konzumaciju vode, prinos telesne mase, koncentracije fluorida, biomarkere redoks statusa, i bioelemente su urađeni u programu *GraphPad Prism 8.0* (La Jolla, Sjedinjene Američke Države). Pomoću *Shapiro-Wilk* testa, proveravano je da li vrednosti imaju normalnu raspodelu ili ne. U slučaju normalne raspodele korišćen je *One-way ANOVA* test i *LSD* test za *post hoc* analizu. U suprotnom, korišćeni su *Kruskal-Wallis/Fridman* testovi i *Dun* test za *post hoc* analizu. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD) u slučaju normalne raspodele, ili kao medijana i interkvartilni opseg u slučaju da raspodela nije normalna. Statistički značajnom je smatrana verovatnoća manja od 0,05 ($p < 0,05$). Za ispitivanje korelacija između eksternih koncentracija/doza i internih doza korišćene su *Pirsonova* korelacija (normalna raspodela) ili *Spirmanova* korelacija (nije normalna raspodela). Eksterna koncentracija F^- predstavlja koncentraciju F^- koja je dodata u vodu za piće; eksterna doza F^- predstavlja koncentraciju F^- koju su životinje unele u organizam putem vode za piće (izračunato na osnovu t.m. i prosečne zapremine popijene vode po grupi); interna doza F^- predstavlja izmerenu koncentraciju F^- u tkivu.

Statističke analize za komet test su urađene u programu *Statistica 6* i *SPPS*. Za procenu značajnosti varijacije IOJ je korišćen *t-test*, sa nivoom značajnosti $p < 0,05$. Za svaku eksperimentalnu životinju, prosečna vrednost oštećenja je izračunata na osnovu 100 ćelija, i dobijeno je 5 vrednosti za

svaku tretiranu grupu. Varijacije u svakoj grupi su označene kao autlajeri, i isključene su iz daljih analiza. Statistička razlika između grupa je testirana primenom t-test-a, sa nivoom značajnosti $p < 0,05$.

Metodologijom statističkog izračunavanja donje granice pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL engl. *Benchmark dose lower confidence limit*) urađena je analiza odnosa doze i efekta, primenom softvera PROAST verzija 70.1 (PROAST Web, Dutch National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, Holandija). U okviru PROAST softvera, optimalnim modelom u okviru Eksponencijalnih i/ili *Hill* familija modela utvrđuje se BMDL na osnovu *Akaike information criterion* (AIC), tj na osnovu najmanje AIC vrednosti (Authority 2009; Hardy i sar., 2017). Dozna zavisnost odnosno efekat se utvrđuje ukoliko je AIC vrednost modela manja od AIC vrednosti specifičnog *null* modela za više od dva. *Null* model označava nepostojanje dozno zavisnog trenda (kriva doza efekat je u vidu horizontalne linije $y=a$), i predstavlja najveću AIC vrednost. *Full* model predstavlja dozno zavisan trend efekta, tj. najmanju AIC vrednost. U okviru ove doktorske disertacije, dva modela (Eksponencijalni i/ili *Hill*) su označavala utvrđivanje toksičnog efekta, i oba su imala dva submodela: jedan sa tri (Eksponencijalni: $y = a * \exp(-bx^d)$; *Hill*: $y = a [1 - x^d / (b^d + x^d)]$) i jedan sa četiri parametara (Eksponencijalni: $y = a * [c - (c - 1) \exp(-bx^d)]$; *Hill*: $y = a [1 + (c - 1) x^d / (b^d + x^d)]$). Ipsilon predstavlja funkciju doze (x) (EFSA 2017). Sofver u izveštaju za *Benchmark response* (BMR) koristi termin veličina kritičnog efekta (CES engl. *critical effect size*), dok za *Benchmark dose* (BMD) koristi termin doza kritičnog efekta (CED engl. *critical effect dose*) (Slob i Pieters 1998). Termini CES i CED su korišćeni u analizi izveštaja ove doktorske disertacije (Slika 6). Interval pouzdanosti CED iznosi 90% i ograničen je donjom (CEDL engl. *lower*) i gornjom (CEDU engl. *upper*) granicom. Odnos CEDU/CEDL označava meru preciznosti CED (Slob 2014). Na izveštaju PROAST softvera, prikazani su sledeći parametri: var-varijansa unutar grupe, a-efekat pri nultoj dozi, b-potentnost hemikalije, c-maksimalni intenzitet efekta, d-nagib krive (Antonijević 2019).

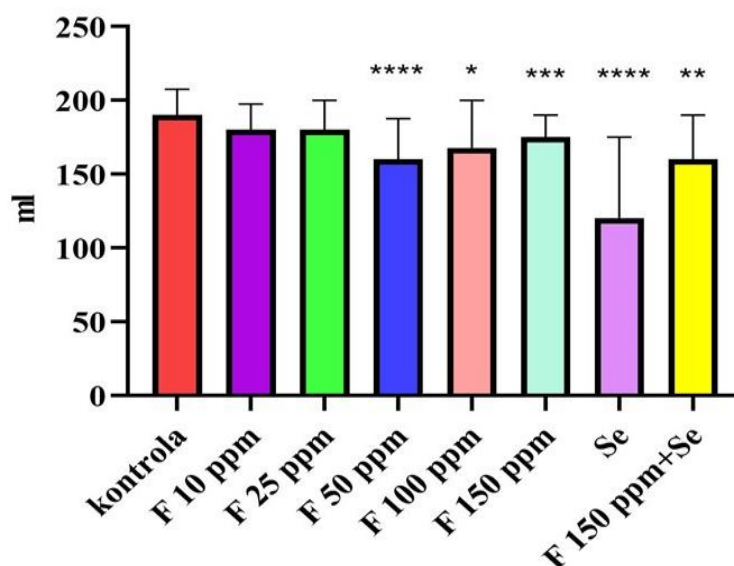


Slika 6. Odnos doze i efekta pri proceni *Benchmark* doze. CES-veličina kritičnog efekta (engl. *critical effect size*); CED-doza kritičnog efekta (engl. *critical effect dose*); CEDL-donja granica pouzdanosti doze (engl. *lower*); CEDU-gornja granica pouzdanosti doze (engl. *upper*).

4. REZULTATI

4.1 Telesna masa eksperimentalnih životinja i unos vode

Fluoridi u koncentraciji od 10 i 25 mg/l nisu uticali na unos vode (Slika 7). Grupe životinja koje su pile vodu sa F⁻ u koncentraciji od 50 mg/l i više, sa Se i kombinacijom Se i F⁻ su značajno manje pile vodu u odnosu na kontrolnu grupu.



Slika 7. Prosečna količina dnevno popijene vode (ml) po grupi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (u poređenju sa kontrolom). Fridman/Dun *post-hoc* test. Vrednosti su prikazane kao medijana i interkvartilni opseg.

Nakon prve nedelje, u svim doznim grupama osim u najnižoj doznoj grupi uočen je statistički značajno smanjen prinos t.m. (Tabela 4). Nakon druge nedelje, značajno smanjen prinos t.m. je uočen u doznim grupama sa 25, 50 i 100 mg/l F⁻ i u grupama sa Se. Nakon treće nedelje, u doznim grupama sa 50 i 100 mg/l F⁻ i u grupama sa Se uočen je takođe značajno smanjen prinos t.m. Nakon 28 dana, vrednosti prinosa t.m. svih eksperimentalnih grupa su bile slične vrednostima kontrole.

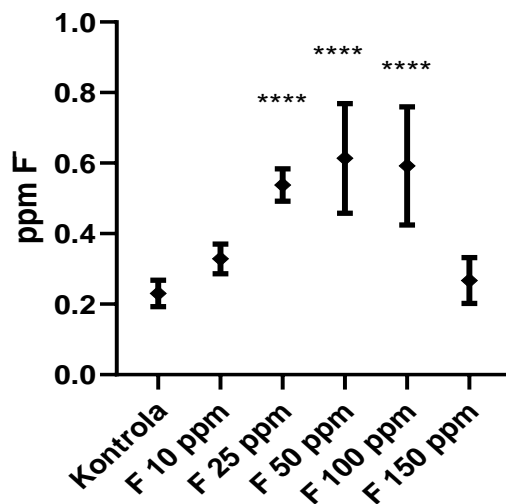
Tabela 4. Uticaj fluorida i/ili selena na telesnu masu pacova.

Grupa	Parametar	1. nedelja	2. nedelja	3. nedelja	4. nedelja
Kontrola	PTM	0,27 ± 0,03	0,68 ± 0,05	1,01 ± 0,08	0,95 ± 0,10
F 10 ppm	PTM	0,25 ± 0,03	0,63 ± 0,07	0,91 ± 0,12	0,97 ± 0,21
	% u odnosu na kontrolu	-7,28 %	-7,82 %	-9,60 %	1,98 %
F 25 ppm	PTM	0,21 ± 0,03*	0,59 ± 0,07*	0,93 ± 0,13	0,97 ± 0,21
	% u odnosu na kontrolu	-20,86 %	-13,71 %	-7,49 %	1,98 %
F 50 ppm	PTM	0,14 ± 0,06****	0,53 ± 0,09**	0,81 ± 0,12**	0,86 ± 0,14
	% u odnosu na kontrolu	-45,90 %	-22,13 %	-19,46 %	-10,45 %
F 100 ppm	PTM	0,18 ± 0,02**	0,54 ± 0,02**	0,84 ± 0,05*	0,82 ± 0,03
	% u odnosu na kontrolu	-30,20 %	-19,90 %	-16,41 %	-14,11 %
F 150 ppm	PTM	0,17 ± 0,03***	0,59 ± 0,04	0,92 ± 0,08	0,91 ± 0,08
	% u odnosu na kontrolu	-37,11 %	-12,27 %	-8,61 %	-5,16 %
Se	PTM	0,27 ± 0,04	0,47 ± 0,07****	0,83 ± 0,08*	1,10 ± 0,11
	% u odnosu na kontrolu	0,34 %	-15,75 %	-17,39 %	14,93 %
F 150 ppm +Se	PTM	0,19 ± 0,03*** ##	0,57 ± 0,11* #	0,82 ± 0,14**	0,78 ± 0,16##
	% u odnosu na kontrolu	-26,35 %	-15,75 %	-18,18 %	-18,44 %

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD. *One-way ANOVA/LSD post-hoc test.* * # p < 0,05; ** ## < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001. * u poređenju sa kontrolom; # u poređenju sa Se grupom. PTM prinos telesne mase.

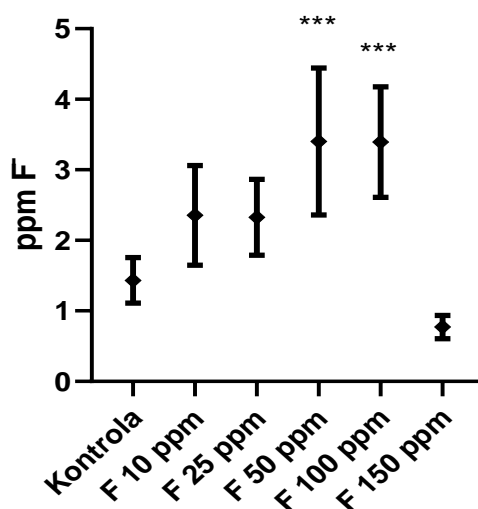
4.2 Distribucija fluorida u jetri, bubrezima, slezini, mozgu, testisima, zubima i femuru pacova koji su pili vodu sa rastućim koncentracijama fluorida

Istraživanjem je ustanovljeno da su u jetri koncentracije F^- značajno povišene u grupama F 25 ppm, F 50 ppm i F 100 ppm (**** $p < 0,0001$) (Slika 8). Najviša srednja koncentracija F^- u jetri pacova izmerena je u grupi koja je pila vodu sa 50 mg/l F^- ($0,61 \pm 0,15$ mg/kg).



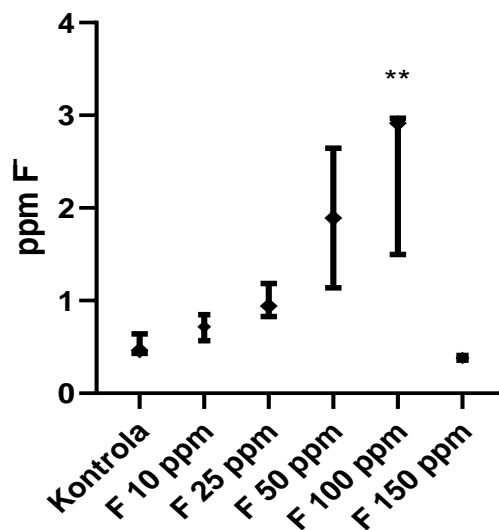
Slika 8. Koncentracija fluorida u jetri pacova koji su pili vodu sa fluoridima tokom 28 dana. *One-way ANOVA/Dun post-hoc*. **** $p < 0,0001$. * u poređenju sa kontrolnom grupom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD.

Nadalje, istraživanjem je ustanovljeno da su u bubrezima pacova koji su putem vode za piće dobijali F^- u koncentraciji 50 i 100 mg/l, koncentracije F^- značajno povišene (***) $p < 0,001$) (Slika 9). Najviša srednja koncentracija F^- u bubrezima pacova izmerena je u grupi koja je pila vodu sa 50 mg/l fluorida ($3,40 \pm 0,93$ mg/kg).



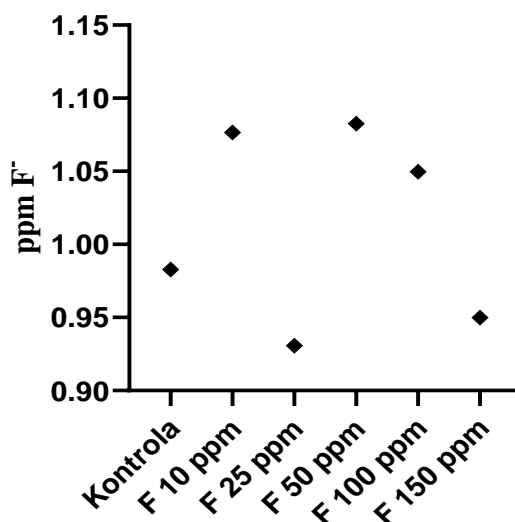
Slika 9. Koncentracija fluorida u bubrezima pacova koji su pili vodu sa fluoridima tokom 28 dana. *One-way ANOVA/Dun post-hoc*. *** $p < 0,001$. * u poređenju sa kontrolnom grupom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD.

Zatim, istraživanjem je ustanovljeno da je u mozgu pacova koji su pili vodu sa 100 mg/l F⁻ koncentracija F⁻ značajno povišena u odnosu na kontrolnu grupu (** p < 0,01) (Slika 10), gde je ujedno izmerena i najviša koncentracija F⁻ (2,46 ± 0,83 mg/kg).



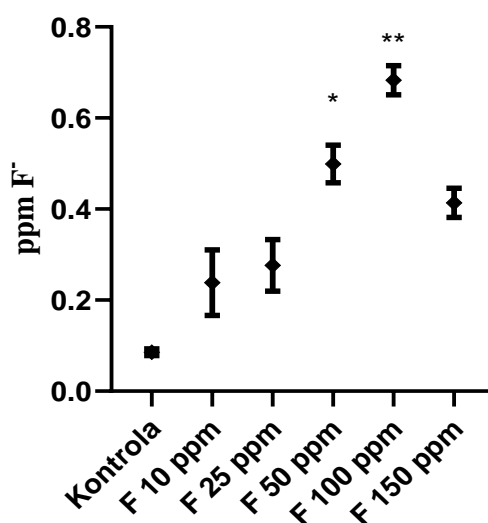
Slika 10. Koncentracija fluorida u mozgu pacova koji su pili vodu sa fluoridima tokom 28 dana. *One-way ANOVA/Dun post-hoc*. ** p < 0,01. * u poređenju sa kontrolnom grupom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD.

Rezultati su pokazali da su koncentracije F⁻ u slezini pacova svih doznih grupa slične koncentracijama kontrolne grupe (Slika 11). Najviša koncentracija F⁻ u slezini pacova izmerena je u grupi koja je pila vodu sa 50 mg/l F⁻ (1,08 ± 0,03 mg/kg).



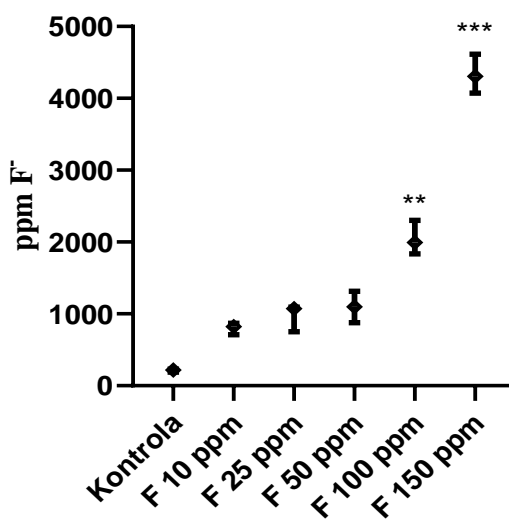
Slika 11. Koncentracija fluorida u slezini pacova koji su pili vodu sa fluoridima tokom 28 dana. *Kruskal-Wallis/Dun post-hoc* test. Rezultati su prikazani kao medijana i interkvartilni opseg.

Istraživanjem je ustanovljeno da su koncentracije F^- u testisima pacova koji su pili vodu sa 50 i 100 mg/l F^- značajno povišene u odnosu na kontrolnu grupu (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) (Slika 12). Najviša srednja koncentracija F^- u testisima pacova izmerena je u grupi koja je pila vodu sa 100 mg/l fluorida ($0,68 \pm 0,04$ mg/kg).



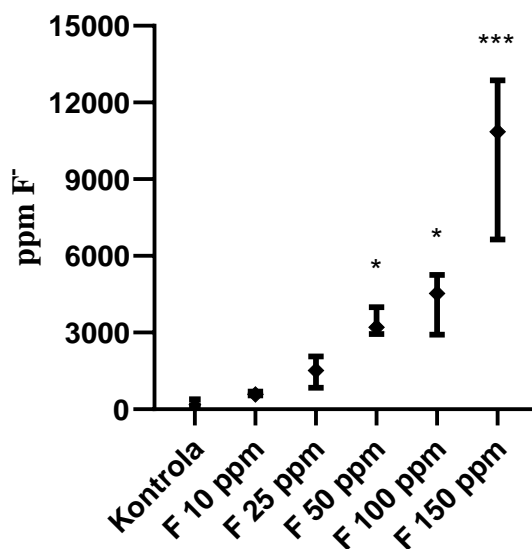
Slika 12. Koncentracija fluorida u testisima pacova koji su pili vodu sa fluoridima tokom 28 dana. Kruskal-Wallis/Dun *post-hoc* test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. * u poređenju sa kontrolnom grupom. Rezultati su prikazani kao medijana i interkvartilni opseg.

Zatim, analizom je ustanovljeno da su koncentracije F^- u zubima pacova koji su pili vodu sa 100 i 150 mg/l F^- značajno povišene u odnosu na kontrolnu grupu (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (Slika 13). Najviša srednja koncentracija F^- u zubima pacova izmerena je u grupi koja je pila vodu sa 150 mg/l F^- ($4330,95 \pm 272,47$ mg/kg).



Slika 13. Koncentracija fluorida u zubima pacova koji su pili vodu sa fluoridima tokom 28 dana. Kruskal-Wallis/Dun *post-hoc* test. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. * u poređenju sa kontrolnom grupom. Rezultati su prikazani kao medijana i interkvartilni opseg.

Istraživanjem je ustanovljeno da su koncentracije F^- u femuru pacova doznih grupa sa 50, 100 i 150 mg/l F^- značajno povišene (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$) (Slika 14). Najviša srednja koncentracija F^- u femuru pacova izmerena je u grupi koja je pila vodu sa 150 mg/l F^- ($10125,6 \pm 3172,6$ mg/kg).



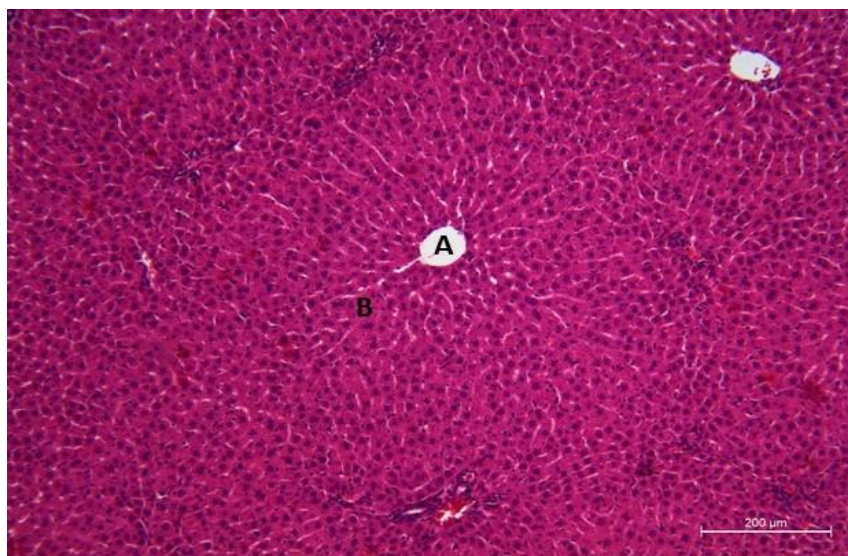
Slika 14. Koncentracija fluorida u femuru pacova koji su pili vodu sa fluoridima tokom 28 dana. *Kruskal-Wallis/Dun post-hoc* test. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. * u poređenju sa kontrolnom grupom. Rezultati su prikazani kao medijana i interkvartilni opseg.

4.3 Histološke analize

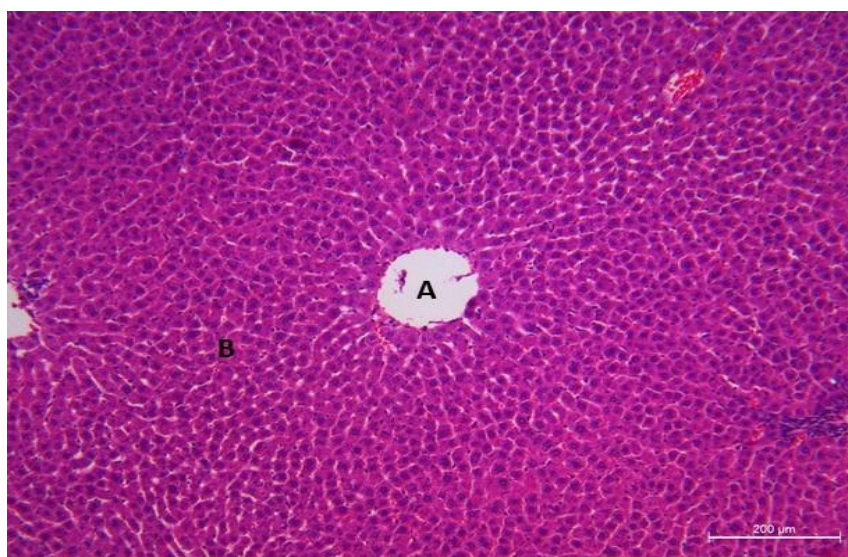
Makroskopskim pregledom analiziranih organa eksperimentalnih pacova nisu uočena odstupanja od fiziološke građe, odnosno nisu zabeležene promene veličine, konzistencije i oblika tkiva jetre, bubrega, slezine, mozga, zuba i femura pacova.

4.3.1 Patohistološki nalaz jetre pacova tretiranih rastućim koncentracijama fluorida

Histološkim ispitivanjem preseka tkiva jetre životinja iz kontrolne grupe, kao i iz grupe koja je pila vodu sa 10 mg/l F⁻, nisu uočena odstupanja od fiziološke građe (Slike 15 i 16).

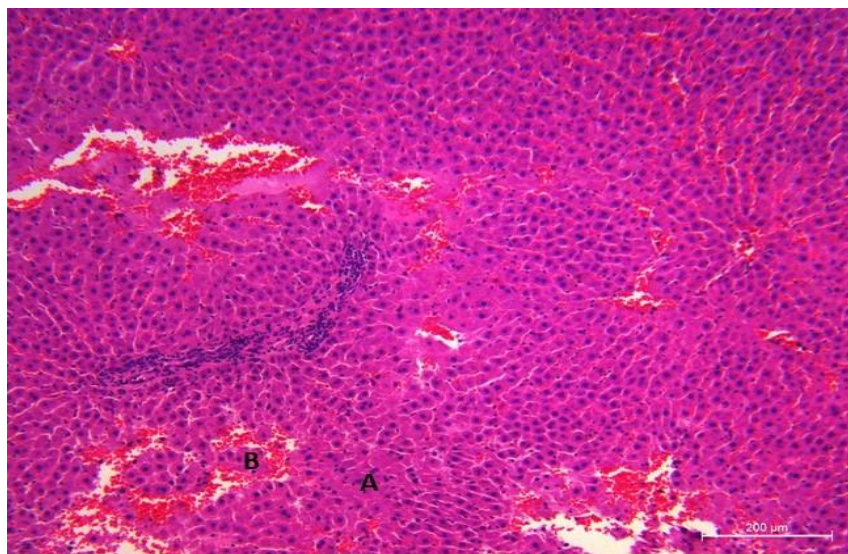


Slika 15. Jetra pacova kontrolne grupe, 100x. A-v. centralis normalne veličine i oblika, okružena centripetalno raspoređenim Remakovim gredicama između kojih su sinusoidni kapilari. B-hepatociti su polugonalnog jedra, acidofilne citoplazme, centralno ili paracentralno postavljenog jedra.



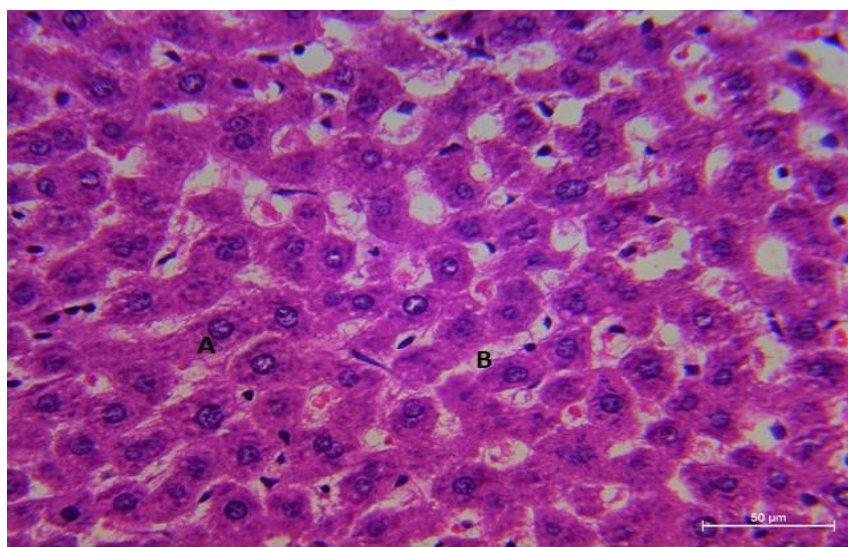
Slika 16. Jetra pacova koji su pili vodu sa 10 mg/l fluorida, 100x. A-v. centralis normalnih dimenzija, nenarušenog integriteta epitela. B-hepatociti fiziološke citoarhitektonike, sinusoidi normalne veličine.

Histološkim ispitivanjem preseka tkiva jetre pacova koji su pili vodu sa 25 mg/l F⁻, uočene su sledeće promene: dilatacija v. centralis, vaskularna kongestija, i nepravilan raspored hepatocita (Slika 17).

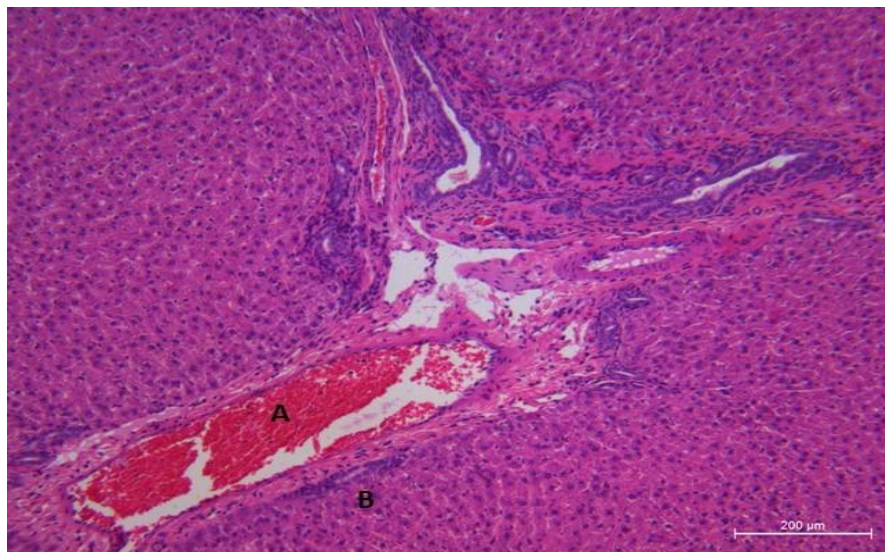


Slika 17. Jetra pacova koji su pili vodu sa 25 mg/l fluorida, 100x. A-iregularan raspored hepatocita. B- dilatacija krvnih sudova i vaskularna kongestija.

Patohistološkom analizom tkiva jetre pacova koji su bili izloženi koncentracijama F⁻ od 50 i 100 mg/l, uočena je dilatacija v. centralis i drugih krvnih sudova, kao i vakuolarna degeneracija i iregularna pozicija hepatocita. Takođe, na presecima tkiva jetre prisutni su nuklearna piknoza, vakuolarna parenhimatozna degeneracija („mutno bubrenje”), karioreksa, karioliza, degeneracija citoplazme i sinusoidna dilatacija (Slike 18 i 19).

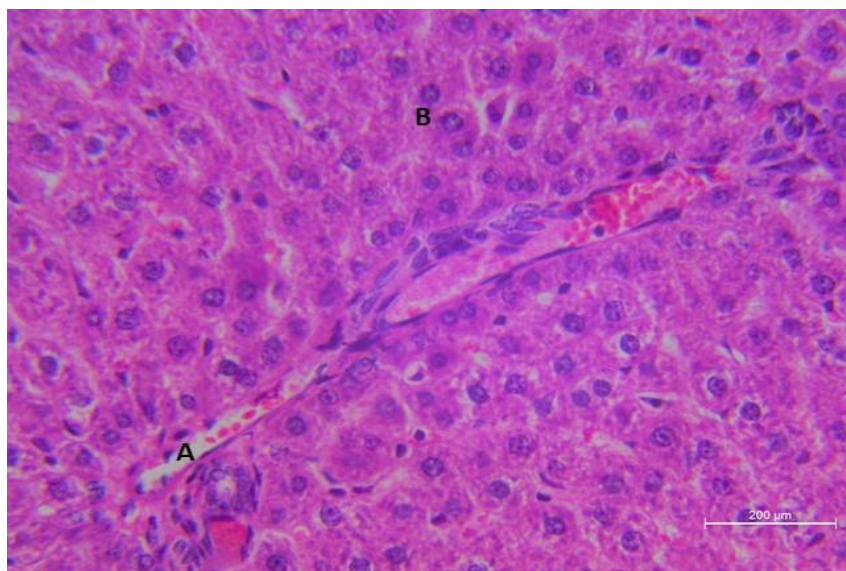


Slika 18. Jetra pacova koji su pili vodu sa 50 mg/l fluorida, 400x. A-nuklearna piknoza, karioliza, degeneracija citoplazme. B-vakuolarna parenhimatozna degeneracija („mutno bubrenje”), sinusoidna dilatacija, sinusoidi su ispunjeni eritrocitima i ćelijama zapaljenja.



Slika 19. Jetra pacova koji su pili vodu sa 100 mg/l fluorida, 100x. A-dilatacija krvnog suda. B-iregularan raspored hepatocita, ćelijski zapaljenski infiltrat.

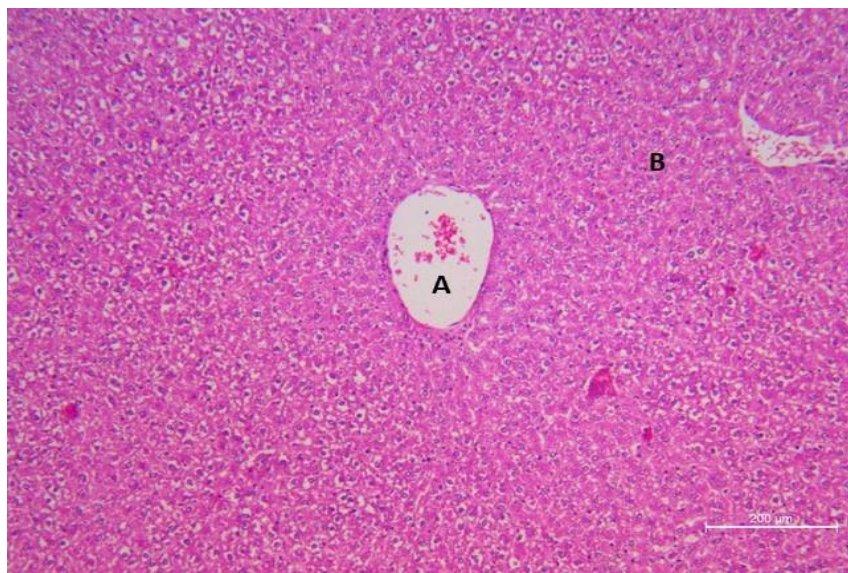
U tkivima jetre pacova grupe F 150 ppm, uočena je dilatacija krvnih sudova. Takođe, prisutan je prekid integriteta epitela, fibroza i zapaljenski infiltrat na krajevima ćelija. Dilatirani krvni sudovi su ispunjeni eritrocitima i zapaljenskim infiltratom. Kod hepatocita se uočavaju degeneracija citoplazme i piknotična jedra (Slika 20).



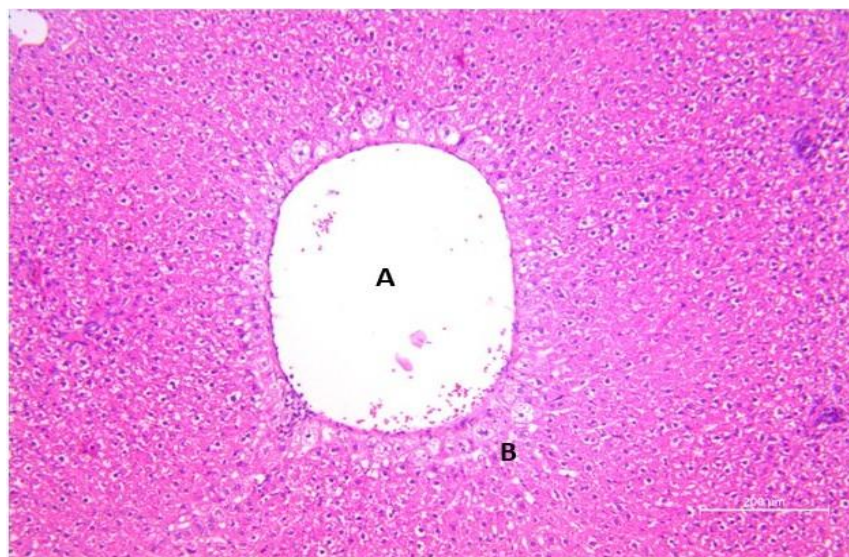
Slika 20. Jetra pacova koji su pili vodu sa 150 mg/l fluorida, 400x. A-dilatacija krvnog suda, krvni sudovi ispunjeni eritrocitima i ćelijama zapaljenja. B-vakuolarna degeneracija hepatocita i citoplazme, piknotična jedra.

4.3.2 Patohistološki nalaz jetre pacova tretiranih fluoridima i selenom

U tkivu jetre pacova koji su pili vodu sa Se, uočen je fiziološki histopaloški nalaz, regularna pozicija i izgled hepatocita, sa blagom dilatacijom v. cetralis (Slika 21). Histopatološkim nalazom tkiva jetre pacova koji su pili vodu sa kombinacijom F⁻ i Se, uočena je izrazita vakuolizacija i degeneracija hepatocita, nuklearna piknoza, karioliza, karioreksa i degeneracija citoplazme. Takođe, prisutna je sinusoidna dilatacija, kao i dilatacija krvnih sudova (Slika 22).



Slika 21. Jetra pacova koji su pili vodu sa 1,5 mg/l natrijum-selenita, 100x. A-blaga dilatacija v. centralis. B-fiziološka citoarhitektura.



Slika 22. Jetra pacova koji su pili vodu sa 150 mg/l fluorida i 1,5 mg/l natrijum-selenita, 100x. A-dilatirana v. centralis. B-izrazita vakuolizacija i degeneracija hepatocita iregularnog rasporeda. Nuklearna piknoza, karioliza i degeneracija citoplazme.

4.3.3 Histološka i histomorfometrijska analiza jetre-histološki indeks aktivnosti (HAI engl. histological activity index)

Pomoću HAI indeksa, u Tabeli 5 predstavljen je stepen oštećenja tkiva jetre pacova svih eksperimentalnih grupa nakon subakutne ekspozicije F⁻. Interpretacijom rezultata, možemo zaključiti da su koncentracije F⁻ od 10, 25 i 50 mg/l izazvale minimalnu inflamaciju jetre, dok su koncentracije F⁻ od 100 i 150 mg/l izazvale blagu inflamaciju jetre. U grupi pacova koji su pili vodu sa F⁻ i Se, zabeležena je blaga inflamacija.

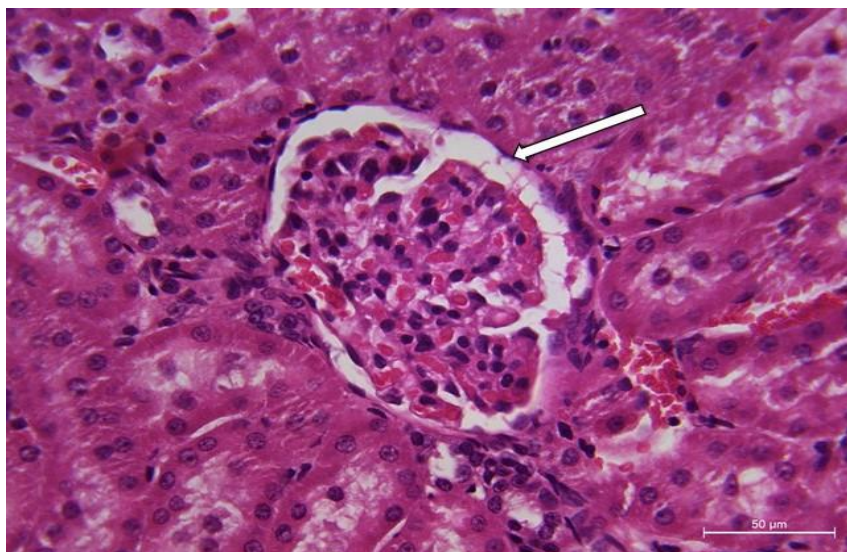
Tabela 5. Histopatološke promene hepatocita kod pacova koji su izloženi rastućim koncentracijama fluorida, selenu i kombinaciji fluorida i selena.

<i>Grupe</i>	<i>Portalna inflamacija</i>	<i>Žarišna litična nekroza</i>	<i>Knodelov skor</i>	<i>Interpretacija</i>
Kontrola	0	0	0	Bez inflamacije
F 10 ppm	0	1	1	Minimalna inflamacija
F 25 ppm	0	1	1	Minimalna inflamacija
F 50 ppm	1	3	4	Minimalna inflamacija
F 100 ppm	2	4	6	Blaga inflamacija
F 150 ppm	4	4	8	Blaga inflamacija
Se	0	0	0	Bez inflamacije
F 150 ppm+Se	2	4	6	Blaga inflamacija

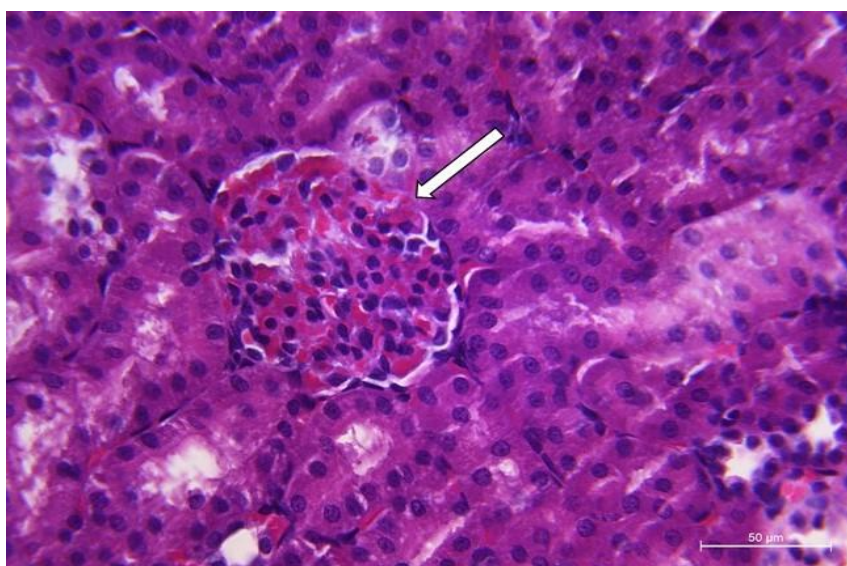
Interpretacija rezultata: 0 nema inflamacije; 1-4 minimalna inflamacija; 5-8 blaga inflamacija; 9-12 umerena inflamacija; 13-18 izražena inflamacija.

4.3.4 Patohistološki nalaz bubrega pacova tretiranih rastućim koncentracijama fluorida

Histološkom analizom poprečnih preseka tkiva bubrega pacova kontrolne grupe i grupe koja je pila vodu sa F^- u koncentraciji od 10 mg/l, nisu uočene patohistološke promene (Slike 23 i 24).

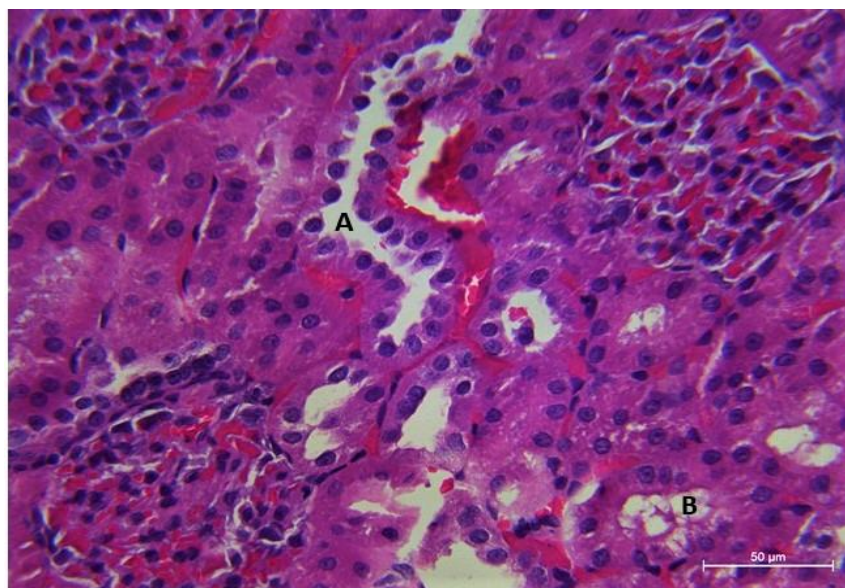


Slika 23. Glomerul bubrega kontrolne životinje, 400x. Glomerul normalne histološke građe. Tubularni epitel normalne citoarhitektonike.



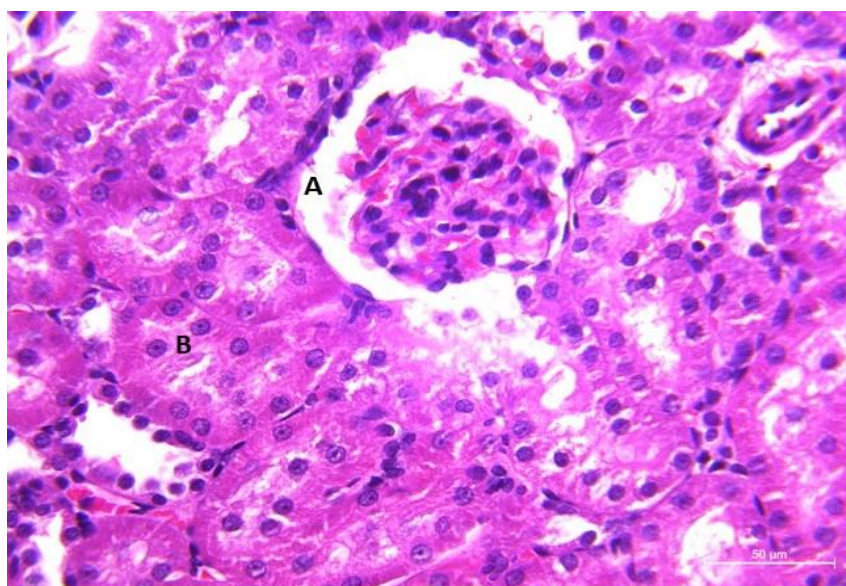
Slika 24. Glomerul bubrega pacova koji su pili vodu sa 10 mg/l fluorida, 400x. Glomerul normalne histološke građe. Tubularni epitel normalne citoarhitektonike.

Histološkom analizom tkiva bubrega pacova koji su pili vodu sa 25 mg/l F^- , uočeni su edem i hiperemija, kao i vakuolizacija ćelija. Intersticijalni prostor bubrega je hiperemičan i hipercelularan. Uočene su nekrotične tubularne ćelije, kao i degeneracija tubularnog epitela (Slika 25).

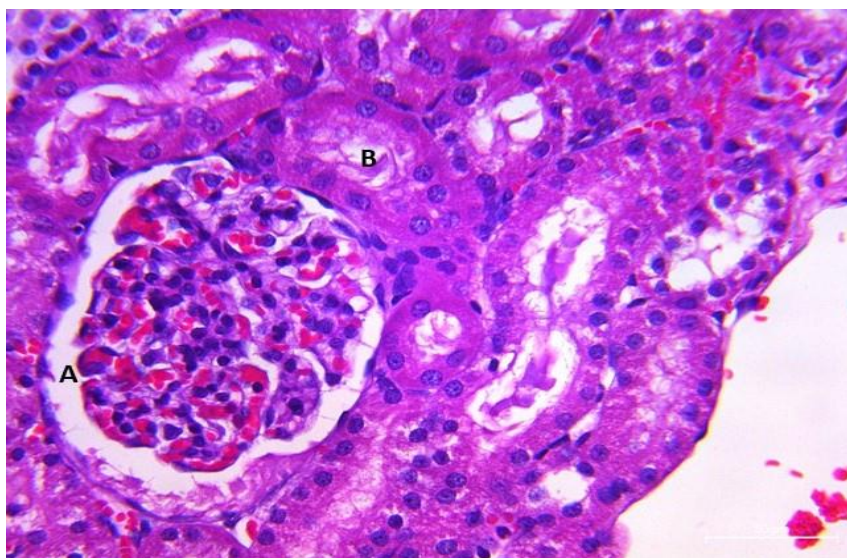


Slika 25. Bubrež pacova koji su pili vodu sa 25 mg/l fluorida, 400x. A-degenerisan tubularni epitel B-„balonirani” glomerul.

Analizom tkiva bubrega pacova grupe F 50 ppm, uočeni su atrofični glomeruli, degeneracija tubularnog epitela i nekrotični renalni tubuli. Takođe, uočena je vaskularna kongestija i oko njih infiltracija inflamatornih ćelija (Slika 26). Histološkom analizom poprečnih preseka tkiva bubrega pacova koji su pili vodu sa 100 mg/l F⁻, uočena je dilatacija i kongestija krvnih sudova. Prisutna je iregularna citoarhitektonika, atrofija i nekroza glomerula. Rastvaranje hromatina (karioliza) i fragmentacija jedra po citoplazmi (karioreksa) su uočeni u većini uzoraka. Prisutni su i ćelijski infiltrati (Slika 27).

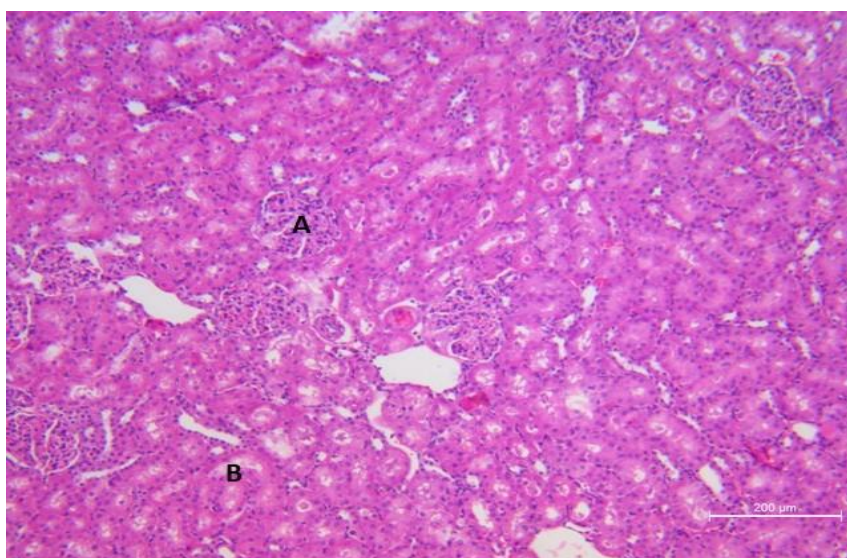


Slika 26. Bubrež pacova koji su pili vodu sa 50 mg/l fluorida, 400x. A-atrofičan glomerul. B-nekrotični renalni tubuli.



Slika 27. Bubrež pacova koji su pili vodu sa 100 mg/l fluorida, 400x. A-atrofija glomerula. B-karioliza i karioreksa.

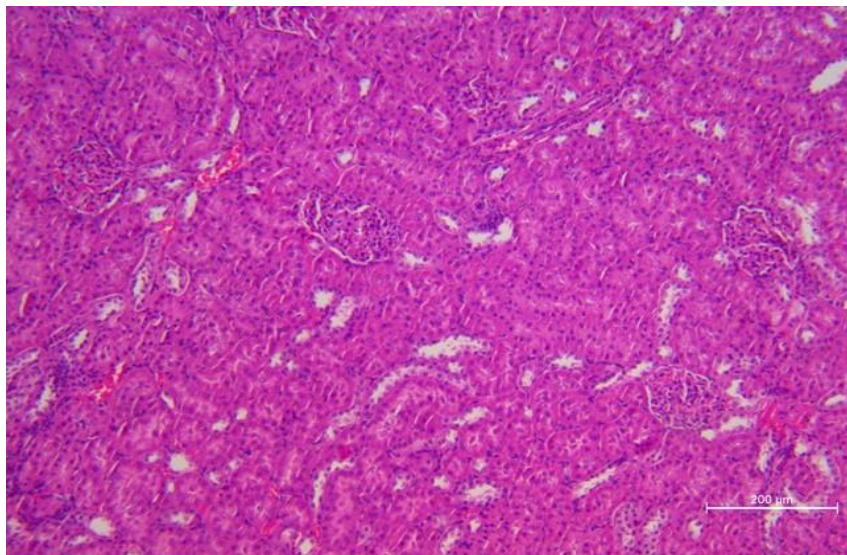
Tkiva bubrega pacova koji su pili vodu sa F^- u koncentraciji od 150 mg/l je hiperemično i edematozno. Prisutna je „balonizacija” i degeneracija tubularnih ćelija. Intersticijalni prostori su ispunjeni krvlju. Prisutna je dilatacija i kongestija krvnih sudova. Analizom tkiva uočena je atrofija glomerula, karioreksa i karioliza (Slika 28).



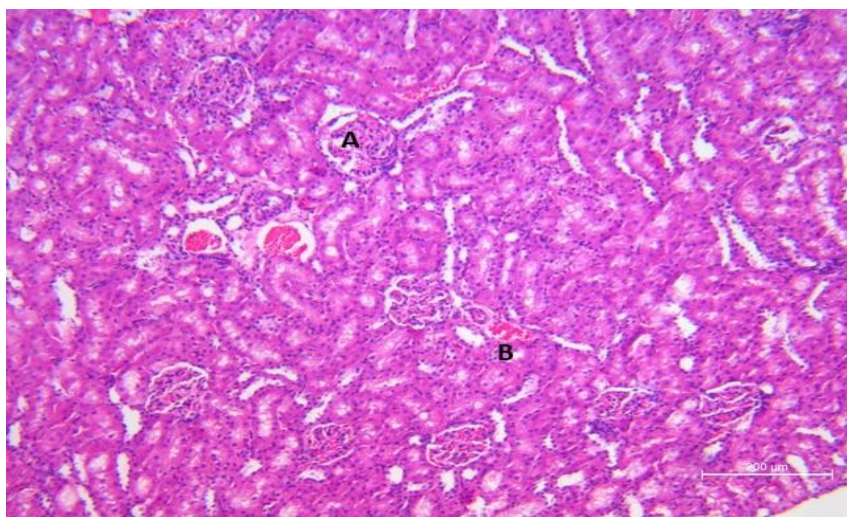
Slika 28. Bubrež pacova koji su pili vodu sa 150 mg/l fluorida, 100x. A-atrofija glomerula. B-karioreksa, karioliza, „balonizacija” tubularnih ćelija.

4.3.5 Patohistološki nalaz bubrega pacova tretiranih fluoridima i selenom

U tkivu bubrega pacova koji su pili vodu sa Se, uočen je normalan histopatološki nalaz, regularna pozicija i izgled glomerula (Slika 29). Histopatološkom analizom tkiva bubrega pacova grupe F 150 ppm+Se, uočena je izrazita „balonizacija” tubula, atrofija i nekroza glomerula, karioliza, karioreksa i degeneracija citoplazme. Takođe, prisutni su dilatacija i kongestija krvnih sudova (Slika 30).



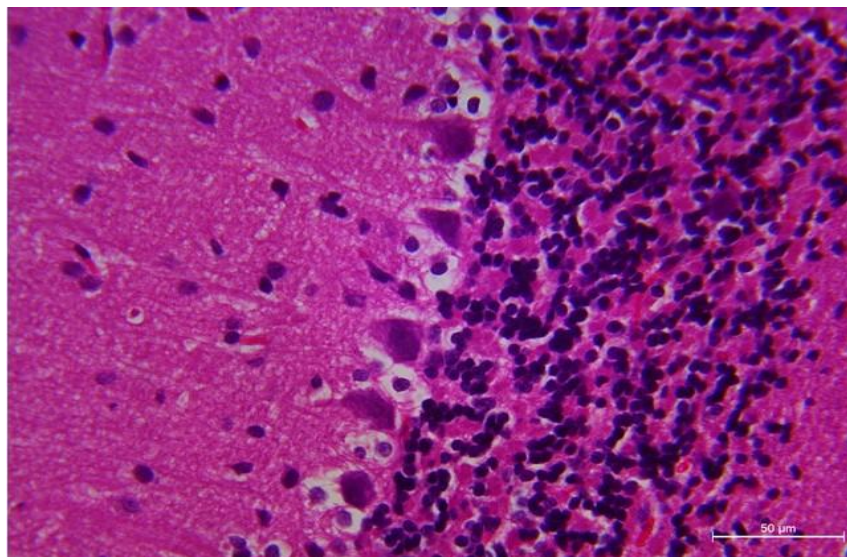
Slika 29. Bubreg pacova koji su pili vodu sa 1,5 mg/l natrijum-selenita, 100x. Fiziološki nalaz tkiva bubrega.



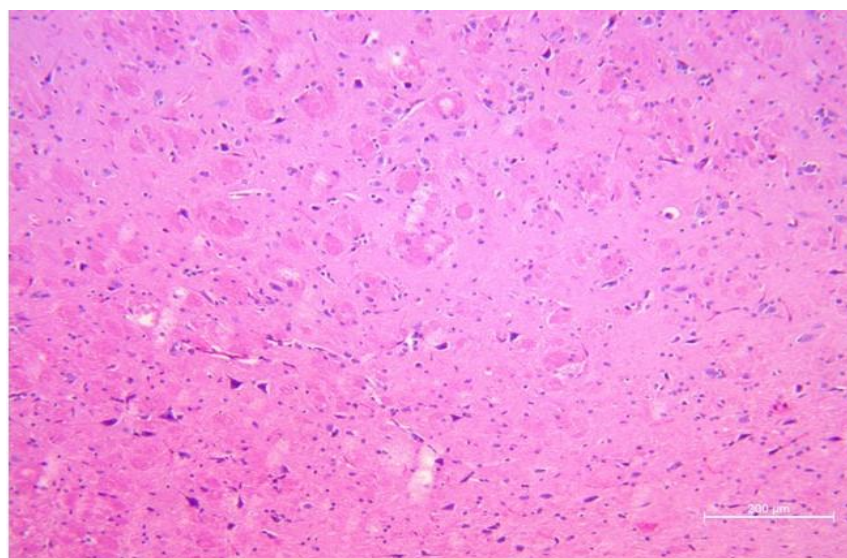
Slika 30. Bubreg pacova koji su pili vodu sa 150 mg/l fluorida i 1,5 mg/l natrijum-selenita, 100x. A-atrofija glomerula. B-dilatacija i kongestija krvnih sudova.

4.3.6 Patohistološki nalaz mozga pacova tretiranih rastućim koncentracijama fluorida i selenom

Histološkom analizom poprečnih preseka tkiva mozga pacova kontrolne grupe koja je pila vodu sa česme, nisu uočene histopatološke promene (Slika 31). Takođe, analizom tkiva mozga u svim ostalim doznim grupama sa F⁻, Se, i kombinacijom F⁻ i Se, nisu zabeležene značajne promene hipokampusa, amigdale, motornog kompleksa i cerebeluma (Slika 32).



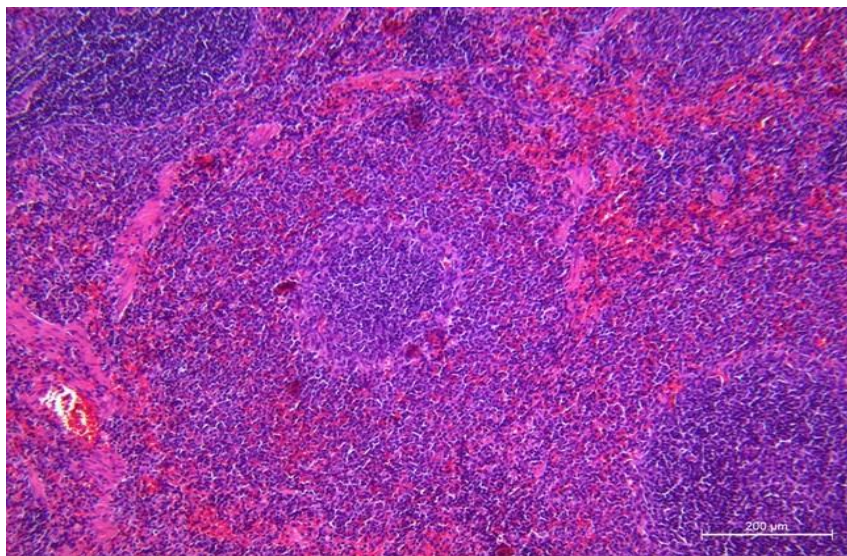
Slika 31. Mozak pacova kontrolne grupe, 400x. Korteks malog mozga. Purkinjeove ćelije normalnog broja, lokalizacije, oblika i veličine, kao i nervna vlakna i glija ćelije.



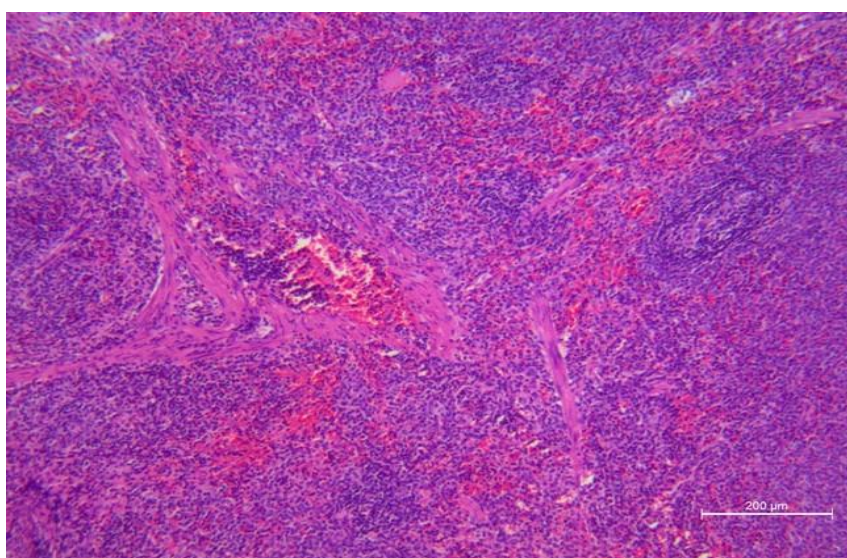
Slika 32. Mozak pacova koji su pili vodu sa 150 mg/l fluorida, 100x. Multipolarni neuroni normalnog oblika i veličine. Glija ćelije sfernog oblika. Nervna vlakna normalne veličine i rasporeda.

4.3.7 Patohistološki nalaz slezine pacova tretiranih rastućim koncentracijama fluorida i selenom

Analizom tkiva slezine pacova kontrolne grupe, kao i grupa pacova koji su pili vodu sa F^- i Se , nisu uočene patohistološke promene u dve glavne funkcionalne zone, crvene (hematogene) pulpe i bele (limfoidne) pulpe. Bela pulpa se nalazi oko centralne arteriole, i sastoji se od periarterijskog limfnog omotača (PALS, T limfociti), okolnih folikula (B limfociti) i marginalne zone, koja se nalazi između crvene i bele pulpe. Crvena pulpa se sastoji od Bilrotovih (engl. *Bilroth*) traka, koje fiziološki okružuju venske sinuse. Citoarhitektura je fiziološka u tkivima slezine svih eksperimentalnih grupa (Slike 33 i 34).



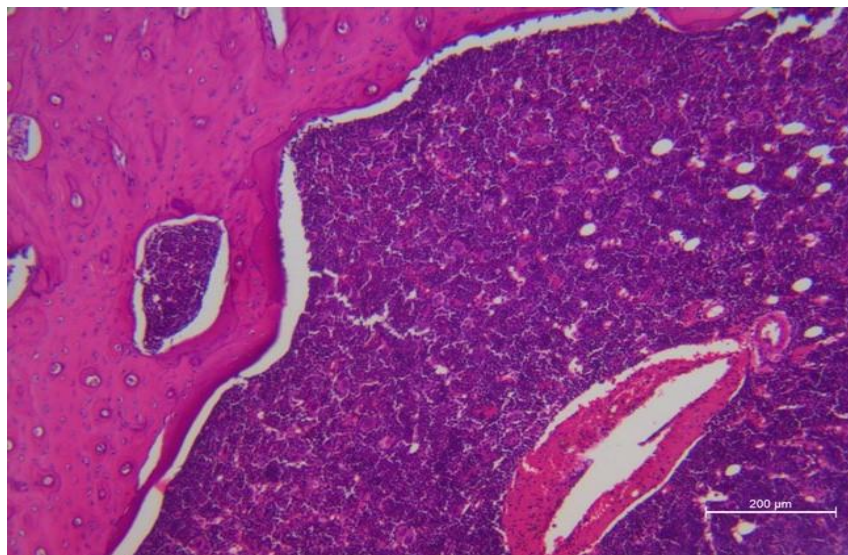
Slika 33. Slezina pacova kontrolne grupe, 100x. Fiziološka citoarhitektura.



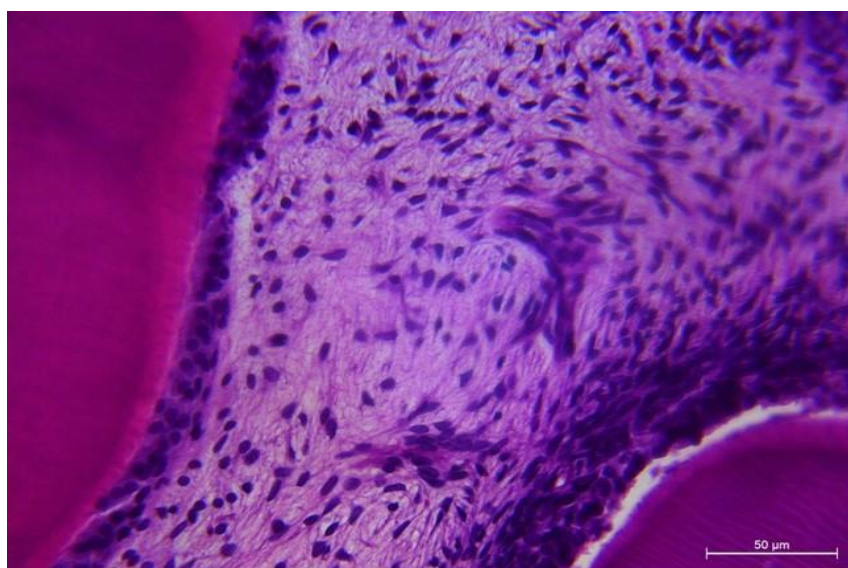
Slika 34. Slezina pacova koji su pili vodu sa 150 mg/l fluorida, 100x. Fiziološki izgled krvnih sudova.

4.3.8 Patohistološki nalaz femura i zuba pacova tretiranih rastućim koncentracijama fluorida i selenom

Analizom levog femura i zuba pacova (sekutića i molara) kontrolne grupe, kao i grupa pacova koji su pili vodu sa F^- i/ili Se, nisu uočene patohistološke promene. Haversovi kanali i lamele femura su fiziološkog izgleda (Slika 35). Dentin, predentin, zona odontoblasta, acelularna Veilova, i celularna zona zuba su takođe fiziološkog izgleda (Slika 36).



Slika 35. Femur pacova koji su pili vodu sa 100 mg/l fluorida, 100x. Fiziološki nalaz

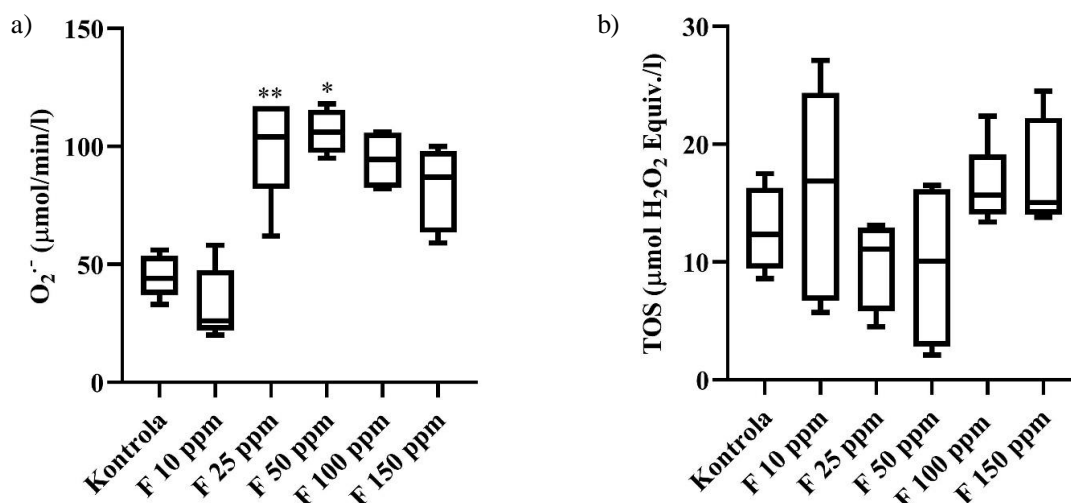


Slika 36. Sekutić pacova koji su pili vodu sa 25 mg/l fluorida, 400x. Pulpa i dentin fiziološkog izgleda.

4.4 Biomarkeri redoks statusa

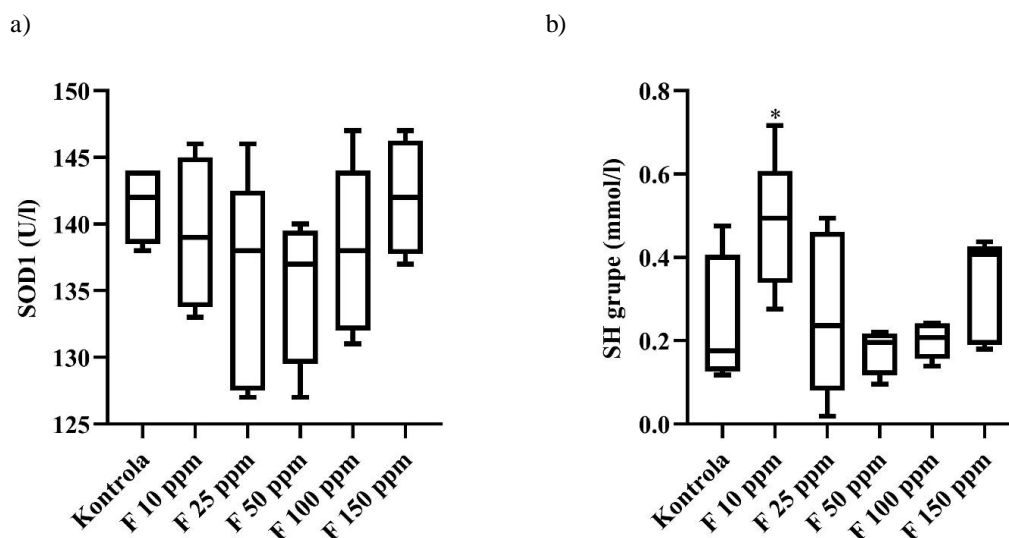
4.4.1 Uticaj fluorida na redoks status u plazmi pacova

Nakon subakutne ekspozicije rastućim koncentracijama F^- , u eksperimentalnim grupama F 25 ppm i F 50 ppm, zabeleženi su značajno povišeni nivoi prooksidativnog biomarkera O_2^- (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$) (Slika 37a). U doznim grupama sa F^- nisu uočene značajne promene TOS (Slika 37b).



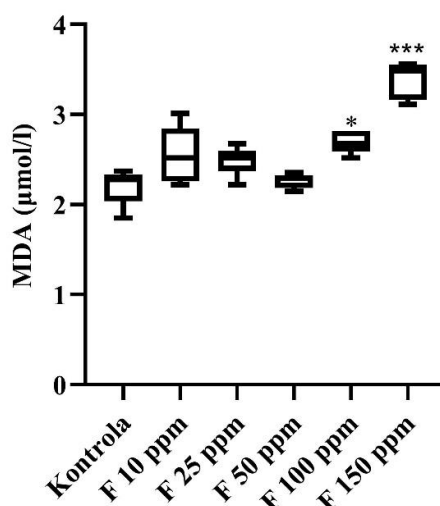
Slika 37. Prooksidativni biomarkeri u plazmi mužjaka *Wistar* pacova nakon subakutne ekspozicije različitim koncentracijama fluorida: a) superoksidni anjon (O_2^-) i b) totalni oksidativni status (TOS). *One-way ANOVA/Fisher LSD test i Kruskal-Wallis/Dun post-hoc test.* * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (u poređenju sa kontrolnom grupom). *Box* predstavlja interkvartilni opseg, gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

U plazmi pacova nisu uočene statistički značajne promene aktivnosti SOD1 (Slika 38a). U eksperimentalnoj grupi F 10 ppm, zabeležen je statistički značajno povišen nivo SH grupa (* $p < 0,05$) (Slika 38b).



Slika 38. Antioksidativni biomarkeri u plazmi mužjaka *Wistar* pacova nakon subakutne ekspozicije različitim koncentracijama fluorida: a) aktivnost superoksid dismutaze (SOD1) i b) ukupne sulfhidrilne grupe (SH). *One-way ANOVA/Fisher LSD test* i *Kruskal-Wallis/Dun post-hoc test*. * $p < 0,05$ (u poređenju sa kontrolnom grupom). *Box* predstavlja interkvartilni opseg, gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

U plazmi pacova grupa F 100 ppm i F 150 ppm zabeležene su značajno povišene vrednosti biomarkera MDA (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$) (Slika 39).



Slika 39. Biomarker oksidativnog oštećenja u plazmi mužjaka *Wistar* pacova nakon subakutne ekspozicije različitim koncentracijama fluorida: malondialdehid (MDA). *Kruskal-Wallis/Dun post-hoc test*. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (u poređenju sa kontrolnom grupom). *Box* predstavlja interkvartilni opseg, gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

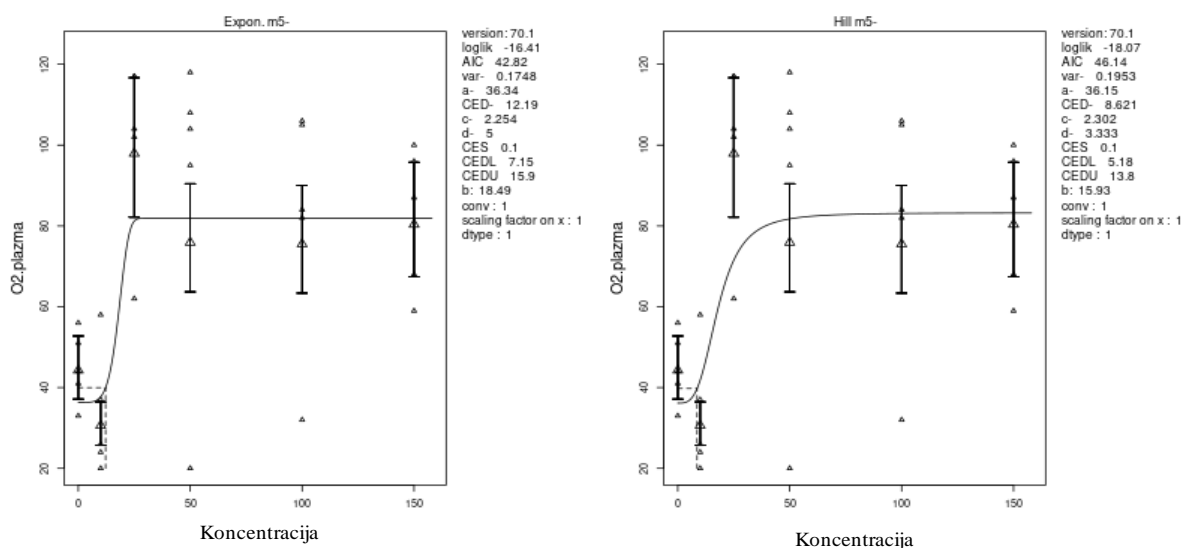
4.4.1.1 Odnos doze i efekta fluorida na parametre redoks statusa u plazmi

Dozna zavisnost u plazmi je potvrđena za efekat F^- na povećanje O_2^- i MDA (Slike 40 i 41). Izračunate su CEDL koncentracije F^- 5,2 mg/l za efekat povećanja nivoa O_2^- i 67,0 mg/l za efekat povećanja nivoa MDA (Tabela 6).

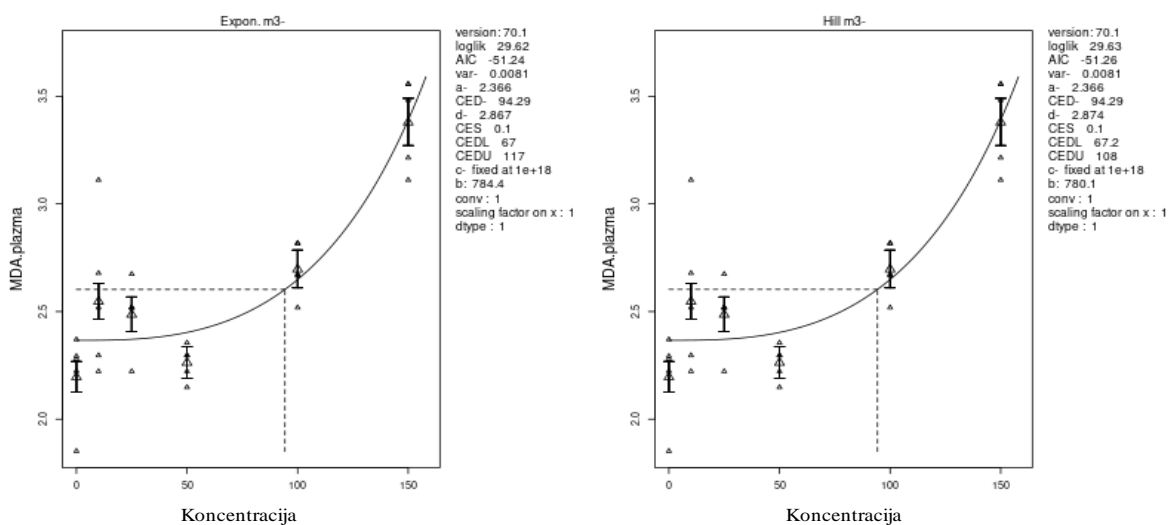
Tabela 6. Parametri modela za efekat fluorida na biomarkere redoks statusa u plazmi pacova.

Biomarker	CED	CEDL	CEDU	D-E trend	Model
	mg/kg F^-				
O_2^-	12,2	7,1	15,9	da↑	Expon. m5-
	8,6	5,2	13,8		Hill m5-
MDA	94,3	67,0	117,0	da↑	Expon. m3-
	94,3	67,2	108,0		Hill m3-

D-E doza efekat



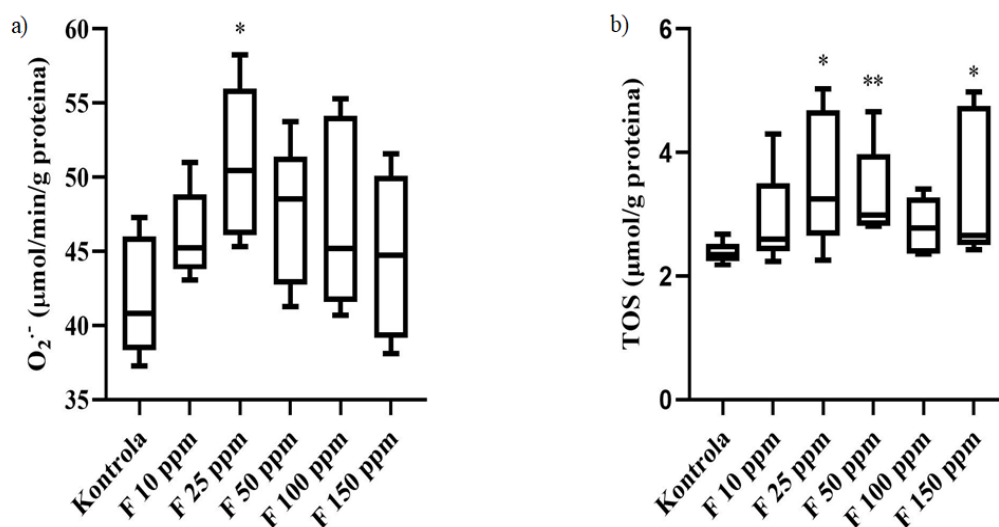
Slika 40. Efekat fluorida na prooksidativni biomarker O_2^- u plazmi pacova.



Slika 41. Efekat fluorida na biomarker oksidativnog oštećenja MDA u plazmi pacova.

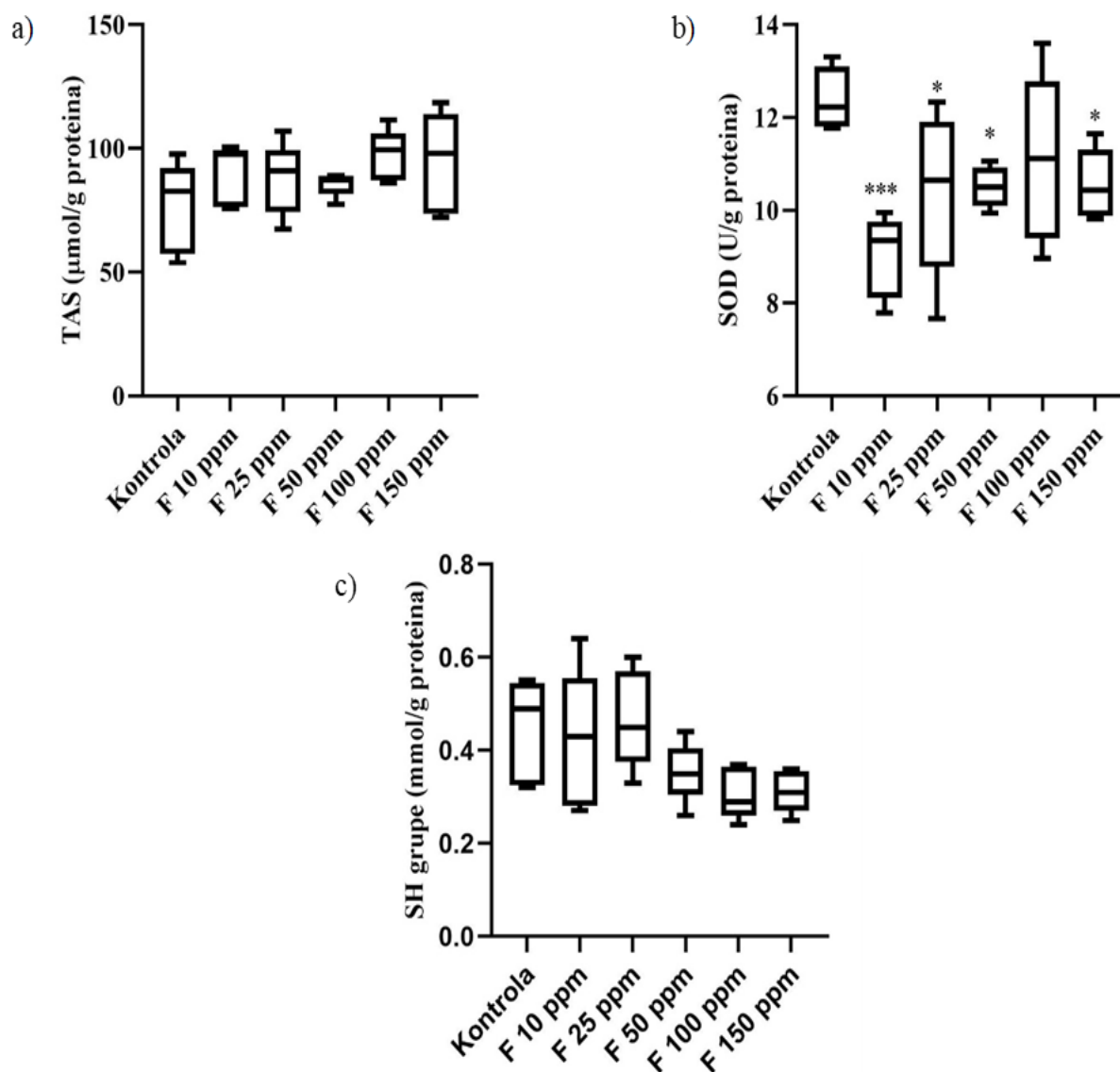
4.4.2 Uticaj fluorida na redoks status u jetri pacova

U tkivu jetre uočene su povišene vrednosti prooksidativnih biomarkera O_2^- i TOS. U grupi F 25 ppm, uočena je značajan porast nivoa O_2^- (* $p < 0,05$) (Slika 42a). U doznim grupama sa 25, 50 i 150 mg/l F^- , uočene su povišene vrednosti TOS (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) (Slika 42b).



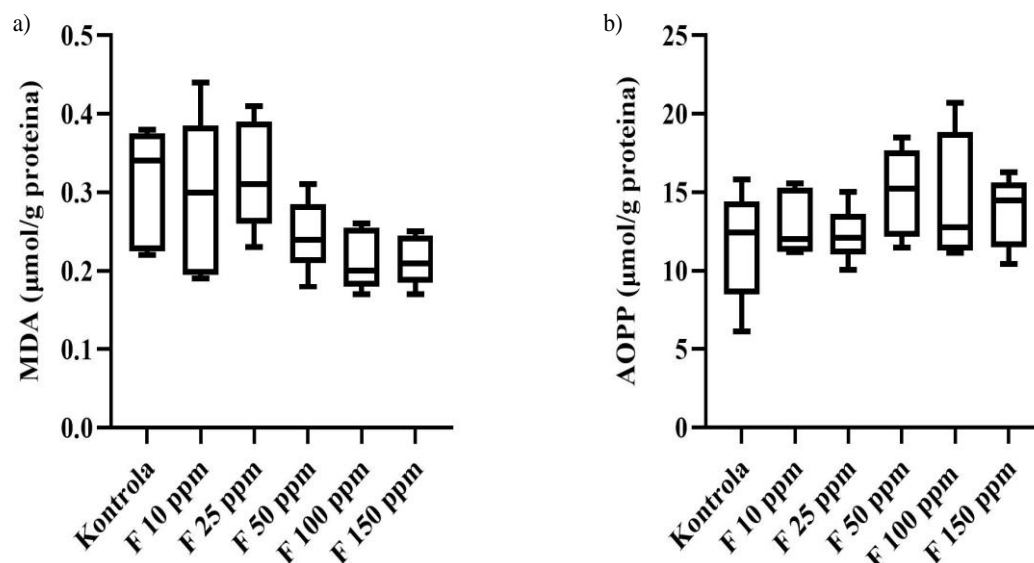
Slika 42. Prooksidativni biomarkeri u jetri mužjaka *Wistar* pacova nakon subakutne ekspozicije različitim koncentracijama fluorida: a) superoksidni anjon (O_2^-) i b) totalni oksidativni status (TOS). *One-way* ANOVA/*Fisher* LSD test i *Kruskal-Wallis/Dun post-hoc* test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (u poređenju sa kontrolnom grupom). *Box* predstavlja interkvartilni opseg, gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

U jetri pacova svih doznih grupa nisu uočene statistički značajne promene nivoa TAS i SH grupa (Slika 43 a i c). Koncentracije F⁻ od 10, 25, 50 i 150 mg/l su dovele do značajnog smanjenja SOD1 aktivnosti (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$) (Slika 43b).



Slika 43. Antioksidativni biomarkeri u jetri mužjaka *Wistar* pacova nakon subakutne ekspozicije različitim koncentracijama fluorida: a) totalni antioksidativni status (TOS), b) aktivnost superoksid dismutaze (SOD1) i c) ukupne sulfhidrilne grupe (SH). *One-way ANOVA/Fisher LSD test i Kruskal-Wallis/Dun post-hoc test.* * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (u poređenju sa kontrolnom grupom). *Box* predstavlja interkvartilni opseg, gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

Analizom tkiva jetre pacova svih doznih grupa nisu uočene značajne promene nivoa MDA i AOPP (Slika 44 a i b).



Slika 44. Biomarkeri oksidativnog oštećenja u jetri mužjaka *Wistar* pacova nakon subakutne ekspozicije različitim koncentracijama fluorida: a) malondialdehid (MDA) i b) uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP). *One-way ANOVA/Fisher LSD test i Kruskal-Wallis/Dun post-hoc test. Box* predstavlja interkvartilni opseg, gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

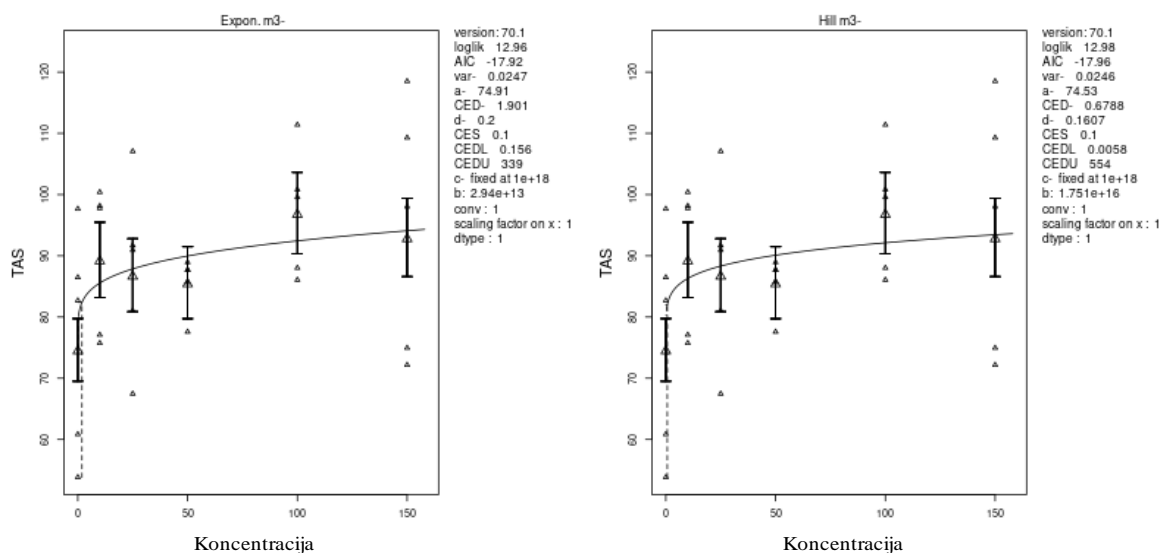
4.4.2.1 Odnos doze i efekta fluorida na parametre redoks statusa u jetri

Dobijena je dozna zavisnost u jetri za efekat F^- na povećanje TAS i $O_2^{\cdot-}$ i smanjenje SH grupa i MDA (Slike 45-48). Izračunate su CEDL koncentracije F^- 0,0 mg/kg za efekat povećanja nivoa TAS, 0,8 mg/kg za efekat povećanja nivoa SH grupa, 1,1 mg/kg za efekat smanjenja nivoa MDA i 0,0 mg/kg za efekat povećanja nivoa $O_2^{\cdot-}$ (Tabela 7).

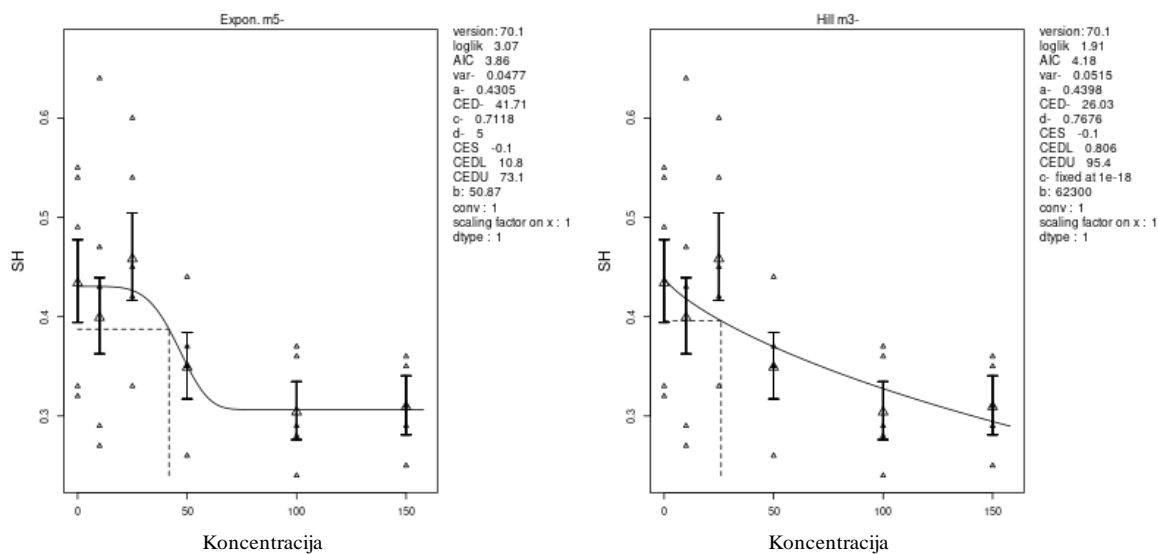
Tabela 7. Parametri modela za efekat fluorida na biomarkere redoks statusa u jetri pacova.

Biomarker	CED	CEDL	CEDU	D-E trend	Model
	mg/kg F^-				
Eksterne koncentracije					
TAS	1,9	0,2	339	da↑	Expon. m3-
	0,7	0,01	554		Hill m3-
SH	41,7	10,8	73,1	da↓	Expon. m5-
	26,0	0,8	95,4		Hill m3-
MDA	41,9	9,6	74,4	da↓	Expon. m5-
	26,9	1,1	94,1		Hill m3-
Interne koncentracije					
$O_2^{\cdot-}$	0,1	0,06	0,2	da ↑	Expon. m5-
	0,04	0,03	0,3		Hill m5-

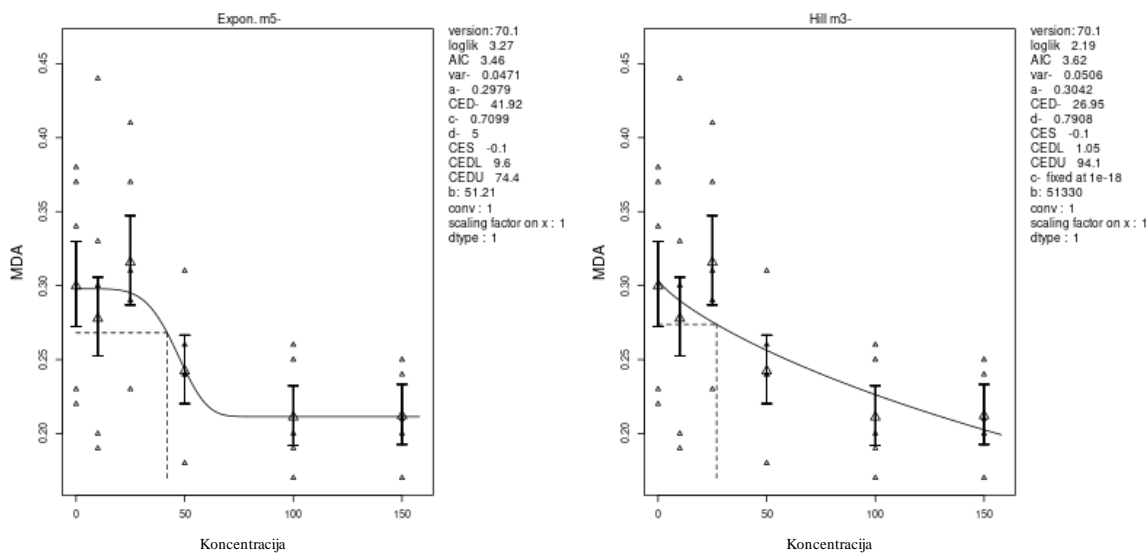
D-E doza efekat



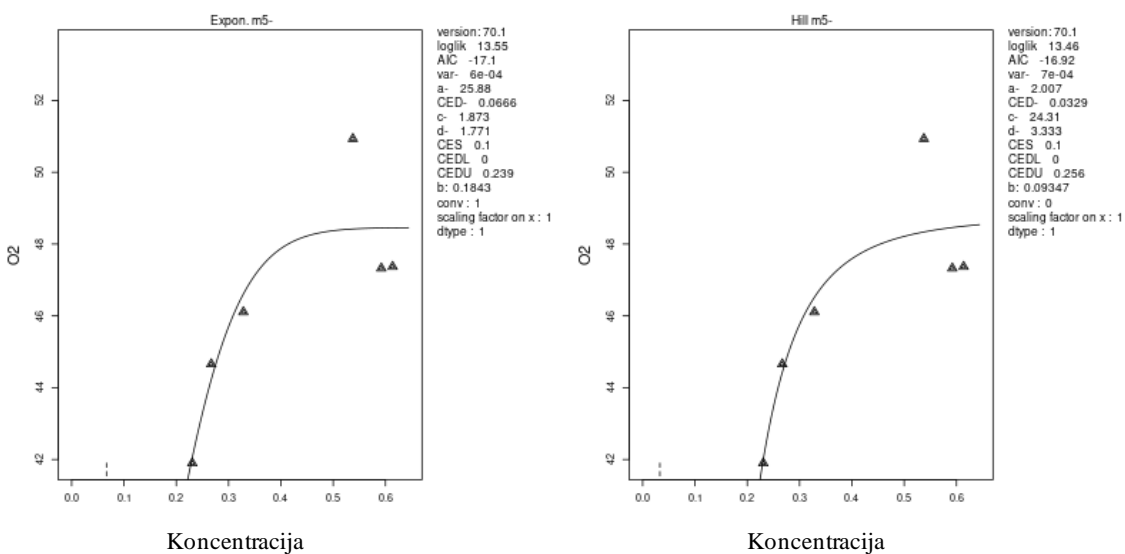
Slika 45. Efekat fluorida na prooksidativni biomarker TAS u jetri pacova.



Slika 46. Efekat fluorida na antioksidativni biomarker SH grupe u jetri pacova.



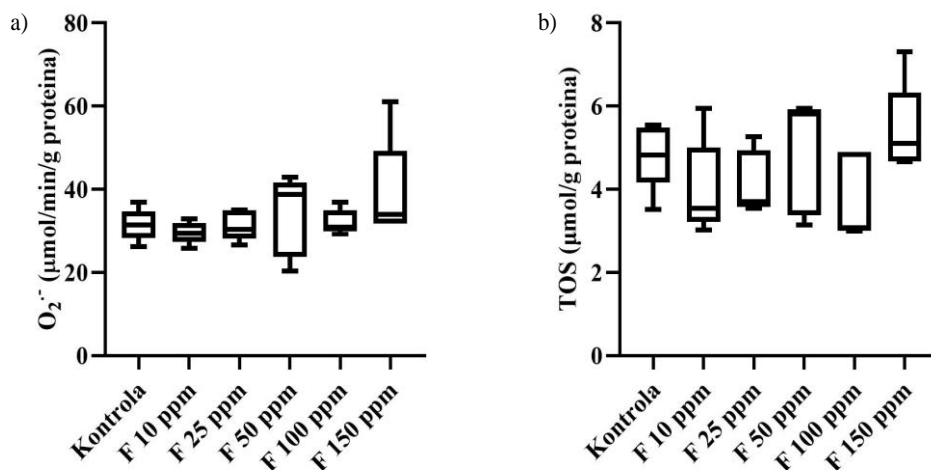
Slika 47. Efekat fluorida na biomarker oksidativnog oštećenja MDA u jetri pacova.



Slika 48. Efekat fluorida na prooksidativni biomarker O_2^- u jetri pacova.

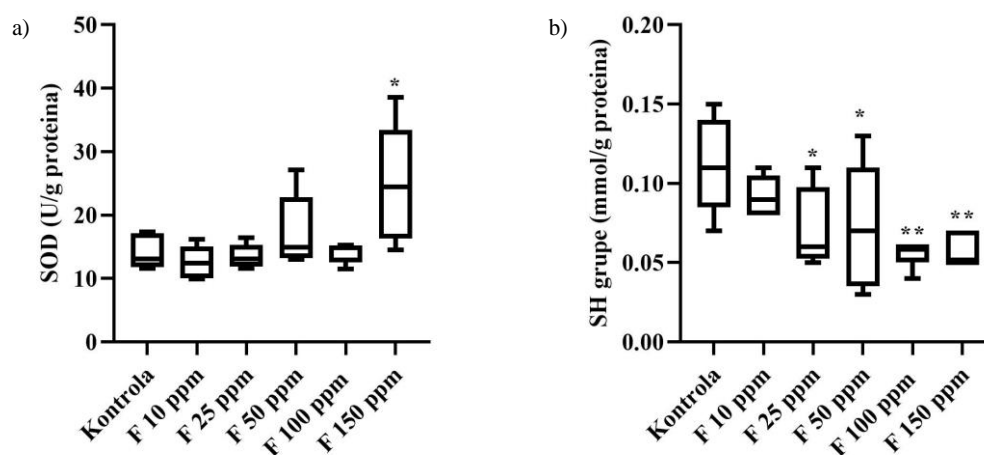
4.4.3 Uticaj fluorida na redoks status u bubrezima pacova

U bubrezima pacova svih doznih grupa nisu uočene statistički značajne promene nivoa $O_2^{\cdot-}$ i TOS (Slika 49 a i b).



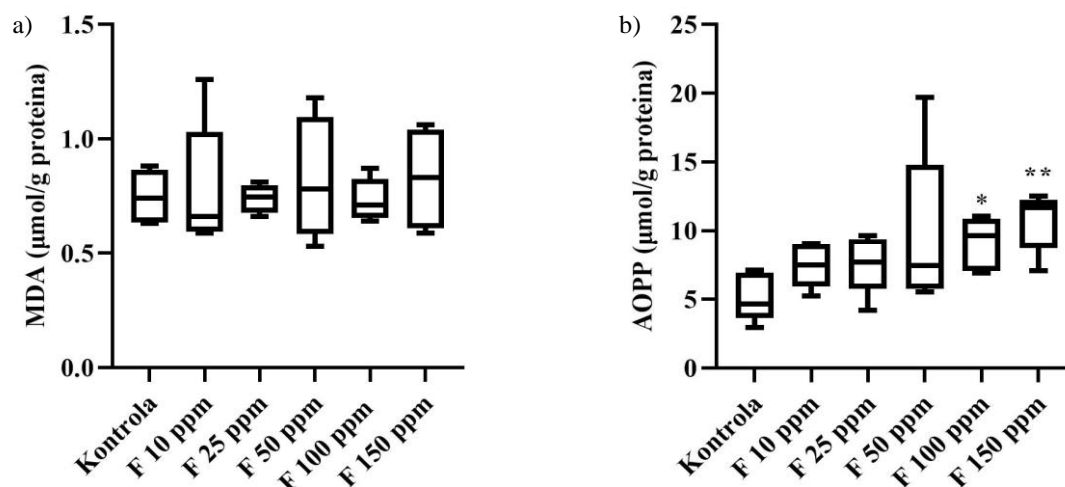
Slika 49. Prooksidativni biomarkeri u bubrezima mužjaka *Wistar* pacova nakon subakutne ekspozicije različitim koncentracijama fluorida: a) superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$) i b) totalni oksidativni status (TOS). *One-way* ANOVA/*Fisher* LSD test i *Kruskal-Wallis*/*Dun post-hoc* test. *Box* predstavlja interkvartilni opseg, gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

U bubrezima pacova koji su pili vodu sa 150 mg/l F^- , zabeležena je povišena SOD1 aktivnost (* $p < 0,05$) (Slika 50a). Vrednost SH grupa u bubrezima životinja je značajno snižena u doznim grupama koje su pile vodu sa 25, 50, 100 i 150 mg/l F^- (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) (Slika 50b).



Slika 50. Antioksidativni biomarkeri u bubrezima mužjaka *Wistar* pacova nakon subakutne ekspozicije različitim koncentracijama fluorida: a) aktivnost superoksid dismutaze (SOD1) i b) ukupne sulfhidrilne grupe (SH). *One-way* ANOVA/*Fisher* LSD test i *Kruskal-Wallis*/*Dun post-hoc* test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (u poređenju sa kontrolnom grupom). *Box* predstavlja interkvartilni opseg, gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

U bubrezima pacova svih doznih grupa nije zabeležena značajna promena nivoa MDA (Slika 51a). U grupama F 100 ppm i F 150 ppm, uočen je značajno povišeni nivo AOPP (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) (Slika 51b).



Slika 51. Biomarkeri oksidativnog oštećenja u bubrezima mužjaka *Wistar* pacova nakon subakutne ekspozicije različitim koncentracijama fluorida: a) malondialdehid (MDA) i b) uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (u poređenju sa kontrolnom grupom). *One-way ANOVA/Fisher LSD test i Kruskal-Wallis/Dun post-hoc test.* *Box* predstavlja interkvartilni opseg, gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

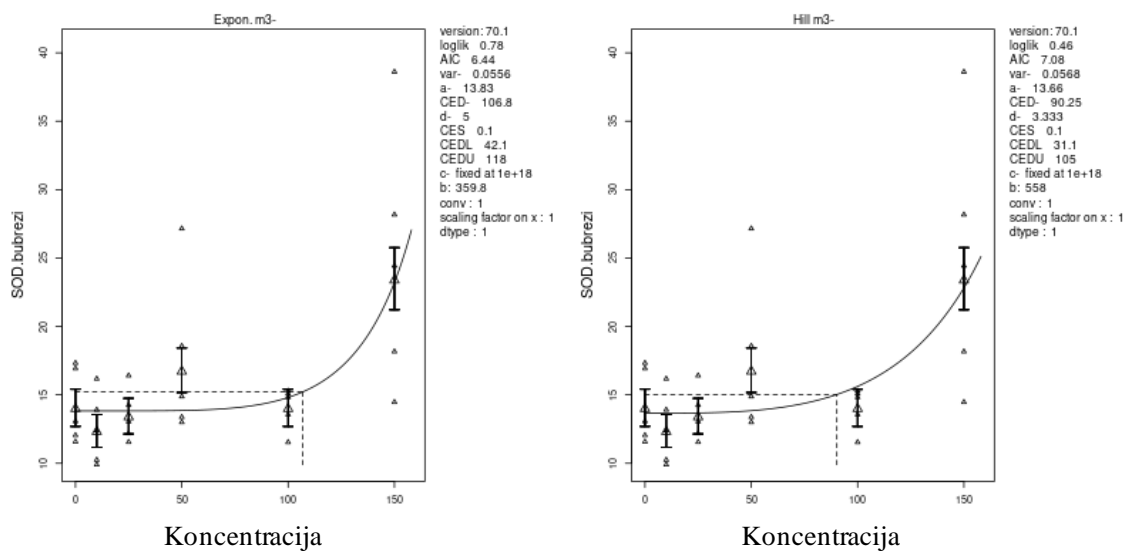
4.4.3.1 Odnos doze i efekta fluorida na parametre redoks statusa u bubrezima

Dobijena je dozna zavisnost u bubrezima za efekat F^- na povećanje SOD1 aktivnosti i vrednosti AOPP, kao i za smanjenje SOD1 aktivnosti i vrednosti SH grupa (Slike 52-55). Izračunate su CEDL koncentracije F^- 31,1 mg/kg za efekat povećanja SOD1 aktivnosti, 0,0 mg/kg za efekat smanjenja nivoa SH grupa, 6,5e-06 mg/kg za efekat povećanja vrednosti AOPP, i 1e-04 mg/kg za efekat smanjenja SOD1 aktivnosti (Tabela 8).

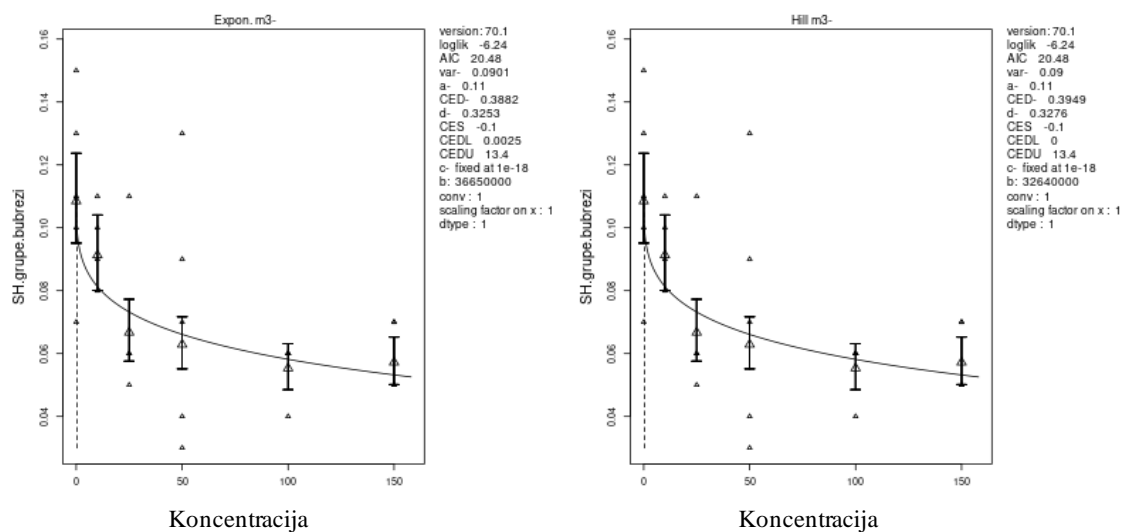
Tabela 8. Parametri modela za efekat fluorida na biomarkere redoks statusa u bubrezima pacova.

Biomarker	CEDL mg/kg F^-			D-E trend	Model
	CED	CEDL	CEDU		
Eksterne koncentracije					
SOD1	106,8	42,1	118,0	da↑	Expon. m3-
	90,2	31,1	105,0	da↑	Hill m3-
SH	0,3	0,002	13,4	da↓	Expon. m3-
	0,4	0,3	13,4	da↓	Hill m3-
AOPP	0,1	0,001	9,9	da↑	Expon. m3-
	0,1	6,5e-06	9,9	da↑	Hill m3-
Interne koncentracije					
SOD1	0,4	1e-04	1,4	da ↓	Expon. m5-
	0,1	0,005	0,9		Hill m5-

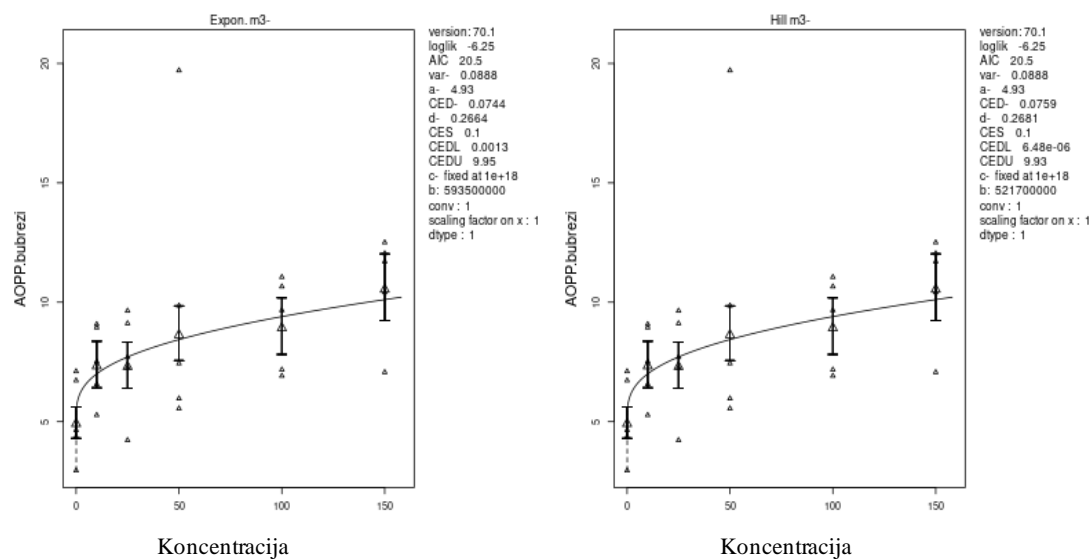
D-E doza efekat



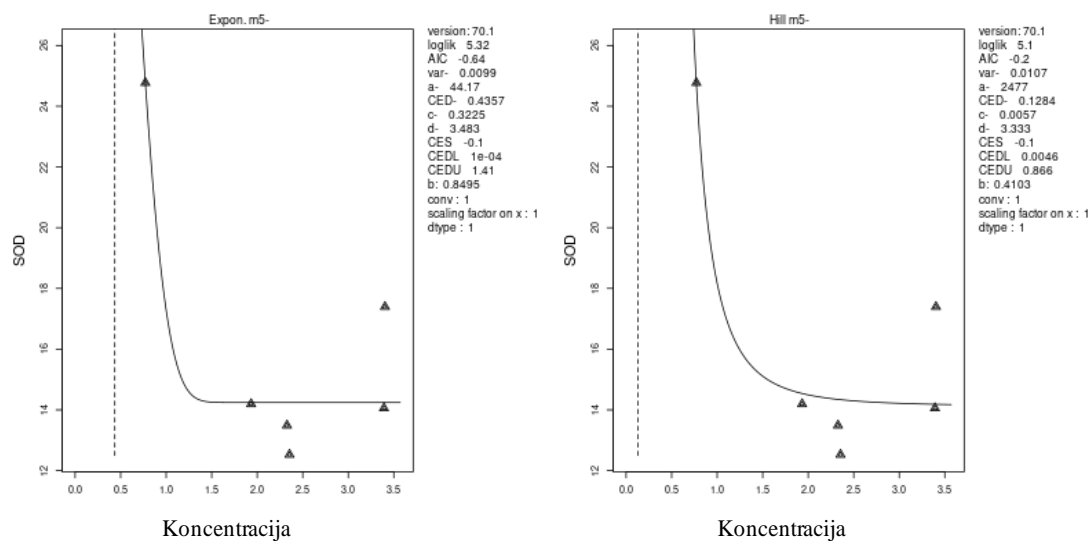
Slika 52. Efekat fluorida na antioksidativni biomarker SOD1 u bubrezima pacova.



Slika 53. Efekat fluorida na antioksidativni biomarker SH grupe u bubrezima pacova.



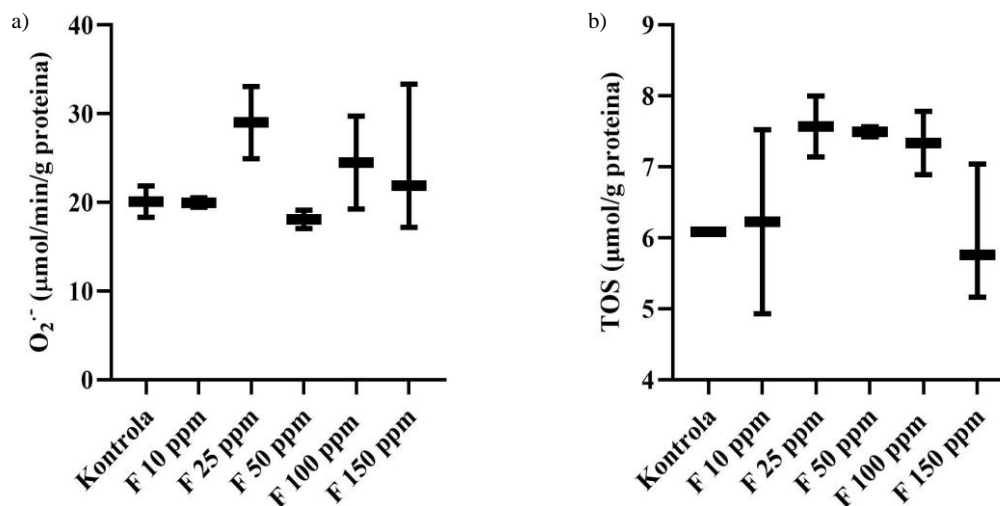
Slika 54. Efekat fluorida na biomarker oskidativnog oštećenja AOPP u bubrezima pacova.



Slika 55. Efekat fluorida na SOD1 aktivnost u bubrezima pacova.

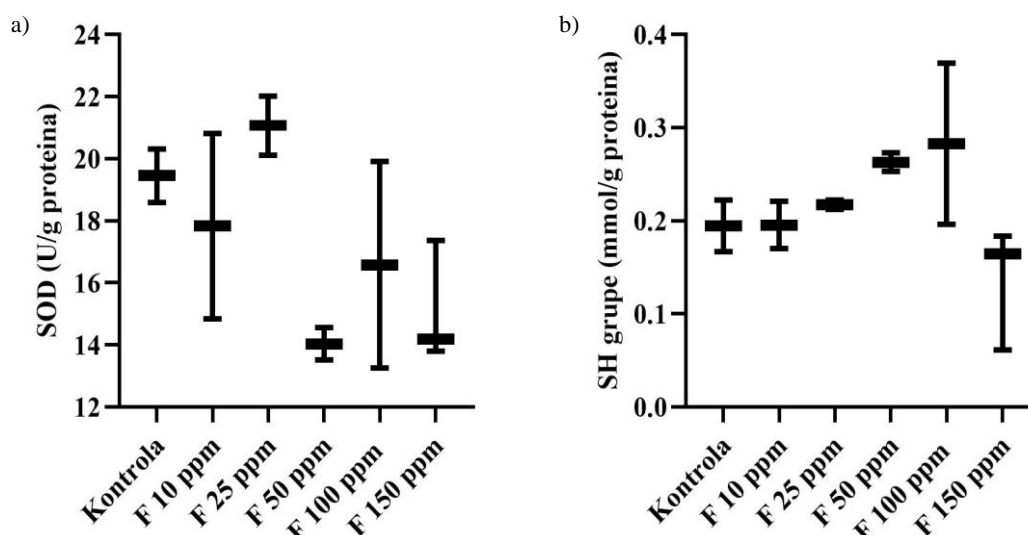
4.4.4 Uticaj fluorida na redoks status u slezini pacova

U slezini pacova doznih grupa koje su pile vodu sa F^- , nisu uočene statistički značajne promene nivoa O_2^- i TOS (Slika 56).



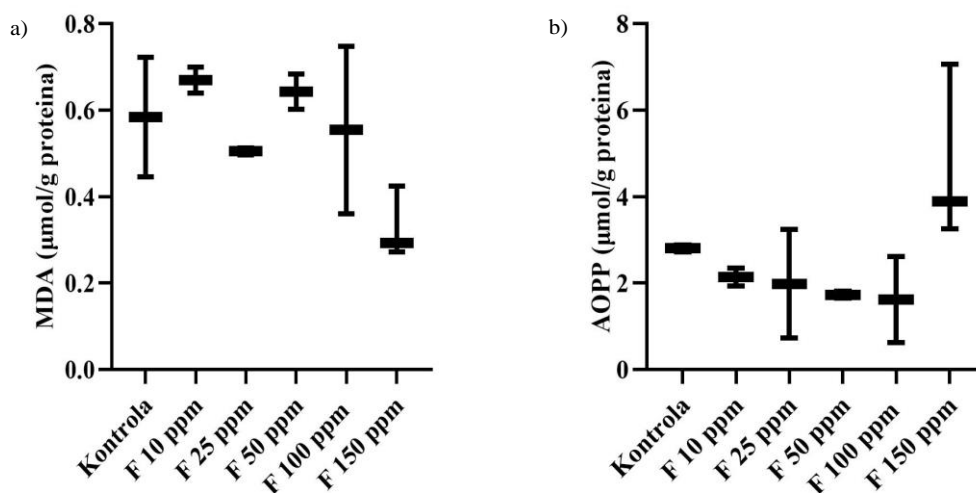
Slika 56. Prooksidativni biomarkeri u slezini mužjaka *Wistar* pacova nakon subakutne ekspozicije različitim koncentracijama fluorida: a) superoksidni anjon (O_2^-) i b) totalni oksidativni status (TOS). *One-way ANOVA/Fisher LSD test i Kruskal-Wallis/Dun post-hoc test.* Box predstavlja interkvartilni opseg, gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar box-a predstavlja medijanu.

Analizom tkiva slezine pacova doznih grupa koje su pile vodu sa F^- , nisu uočene statistički značajne promene SOD1 aktivnosti i nivoa SH grupe (Slika 57).



Slika 57. Antioksidativni biomarkeri u slezini mužjaka *Wistar* pacova nakon subakutne ekspozicije različitim dozama fluorida: a) aktivnost superoksid dismutaze (SOD1) i b) ukupne sulfhidrilne grupe (SH). *One-way ANOVA/Fisher LSD test i Kruskal-Wallis/Dun post-hoc test.* Box predstavlja interkvartilni opseg, gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar box-a predstavlja medijanu.

Analizom MDA i AOPP biomarkera u slezini nisu uočene statistički značajne promene (Slika 58).



Slika 58. Biomarkeri oksidativnog oštećenja u slezini mužjaka *Wistar* pacova nakon subakutne ekspozicije različitim koncentracijama fluorida: a) malondialdehid (MDA) i b) uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP). *One-way ANOVA/Fisher LSD test* i *Kruskal-Wallis/Dun post-hoc test*. *Box* predstavlja interkvartilni opseg, gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

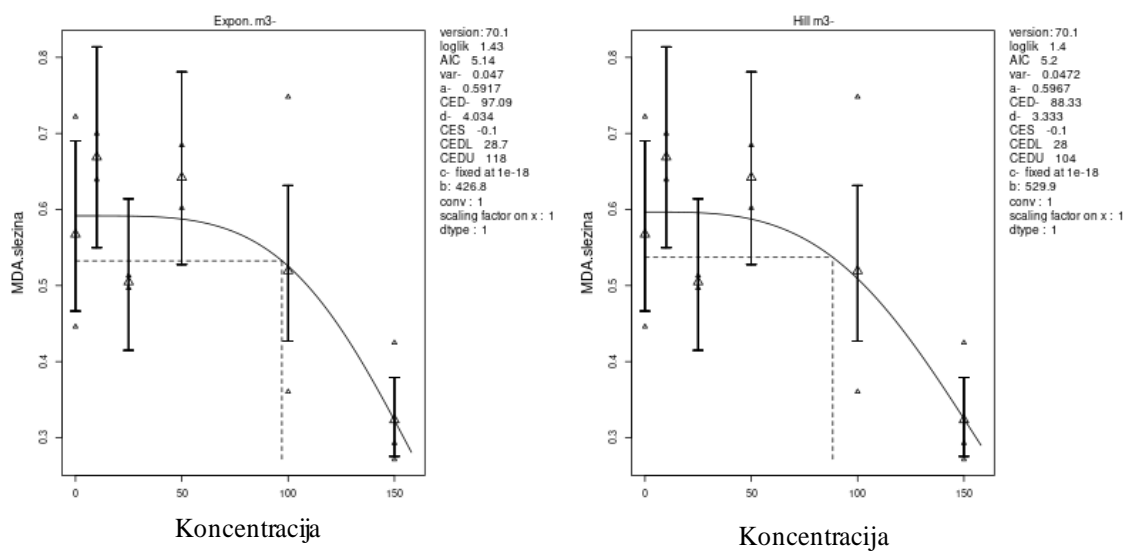
4.4.4.1 Odnos doze i efekta fluorida na parametre redoks statusa u slezini

Dozna zavisnost u slezini je potvrđena za efekat F^- na smanjenje nivoa MDA i SH grupa (Slike 59 i 60). Izračunate su CEDL koncentracije F^- 28,0 mg/kg za efekat smanjenja nivoa MDA i 60,1 mg/kg za efekat smanjenja nivoa SH grupa (Tabela 9).

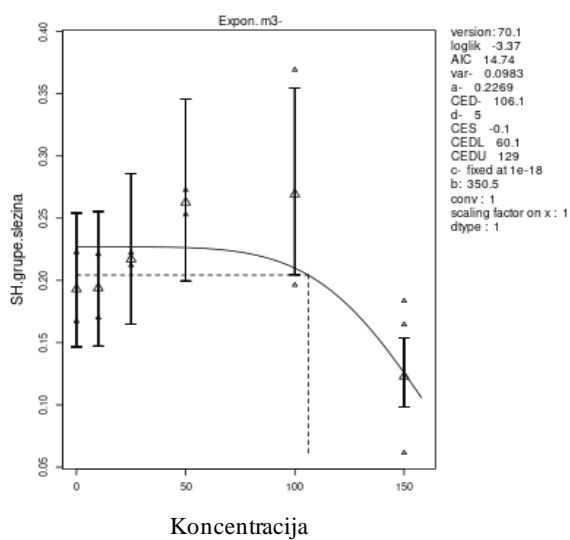
Tabela 9. Parametri modela za efekat fluorida na biomarkere redoks statusa u slezini pacova.

Biomarker	CED	CEDL	CEDU	D-E trend	Model
	mg/kg F^-				
MDA	97,1	28,7	118,0	da↓	Expon. m3-
	88,3	28,0	104,0	da↓	Hill m3-
SH	106,1	60,1	129,0	da↓	Expon. m3-

D-E doza efekat



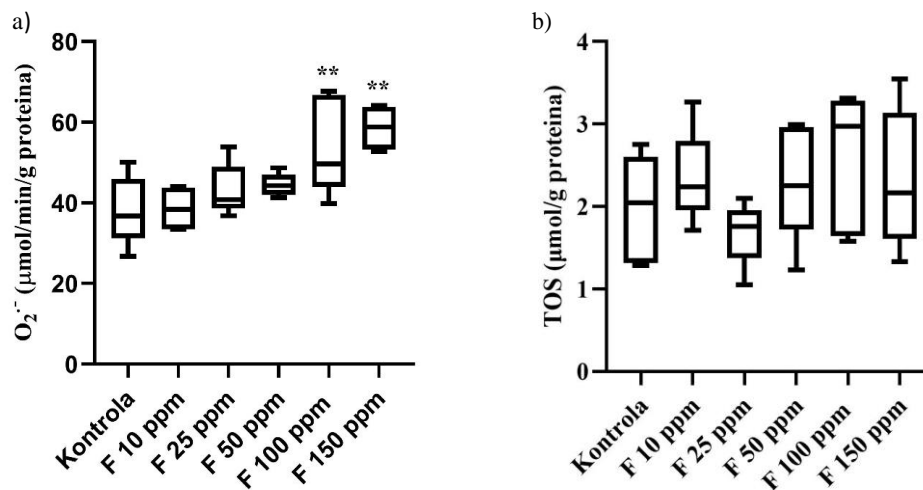
Slika 59. Efekat fluorida na biomarker oksidativnog oštećenja MDA u slezini pacova.



Slika 60. Efekat fluorida na SH grupe u slezini pacova.

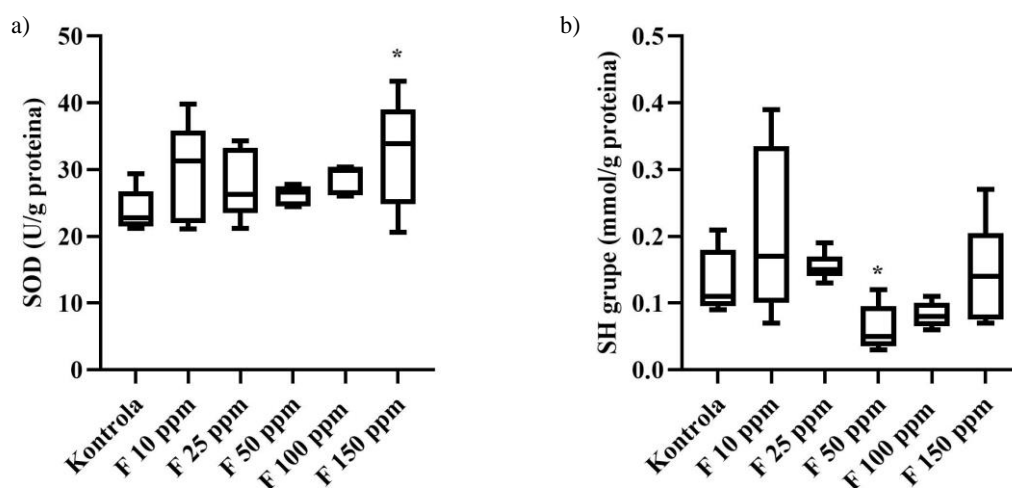
4.4.5 Uticaj fluorida na redoks status u mozgu pacova

U tkivu mozga pacova koji su pili vodu sa različitim koncentracijama F^- , uočen je značajan porast nivoa O_2^- u grupama F 100 ppm i F 150 ppm (** $p < 0,01$) (Slika 61a). Nisu uočene statistički značajne promene TOS u svim doznim grupama (Slika 61b).



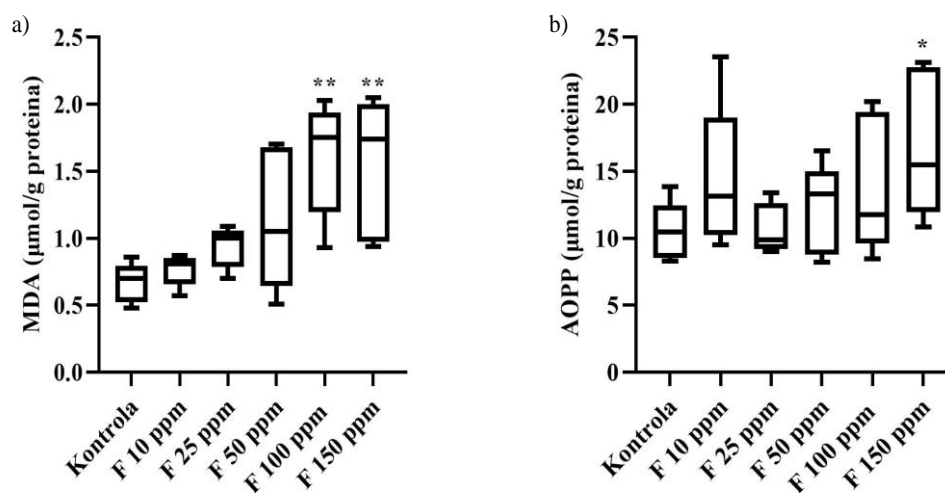
Slika 61. Prooksidativni biomarkeri u mozgu mužjaka *Wistar* pacova nakon subakutne ekspozicije različitim koncentracijama fluorida: a) superoksidni anjon (O_2^-) i b) totalni oksidativni status (TOS). ** $p < 0,01$ (u poređenju sa kontrolnom grupom). One-way ANOVA/Fisher LSD test i *Kruskal-Wallis/Dun post-hoc* test. *Box* predstavlja interkvartilni opseg, gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

U tkivu mozga pacova doznih grupa, uočena je statistički značajna povišena aktivnost SOD1 u grupi F 150 ppm (* $p < 0,05$) (Slika 62a). U grupi koja je pila vodu sa 50 mg/l F^- , nivo SH grupa je značajno snižen (* $p < 0,05$) (Slika 62b).



Slika 62. Antioksidativni biomarkeri u mozgu mužjaka *Wistar* pacova nakon subakutne ekspozicije različitim koncentracijama fluorida: a) aktivnost superoksid dismutaze (SOD1) i b) ukupne sulfhidrilne grupe (SH). One-way ANOVA/Fisher LSD test i *Kruskal-Wallis/Dun post-hoc* test. * $p < 0,05$ (u poređenju sa kontrolnom grupom). *Box* predstavlja interkvartilni opseg, gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

Zatim, u mozgu pacova koji su pili vodu sa 100 i 150 mg/l F⁻, zabeležen je značajno viši nivo MDA biomarkera (** p < 0,01) (Slika 63a). Zatim, kod pacova koji su pili vodu sa 150 mg/l F⁻ uočen je značajan porast AOPP (* p < 0,05) (Slika 63b).



Slika 63. Biomarkeri oksidativnog oštećenja u mozgu mužjaka *Wistar* pacova nakon subaktune ekspozicije različitim koncentracijama fluorida: a) malondialdehid (MDA) i b) uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP). * p < 0,05; ** p < 0,01 (u poređenju sa kontrolnom grupom). *One-way ANOVA/Fisher LSD test* i *Kruskal-Wallis/Dun post-hoc test*. *Box* predstavlja interkvartilni opseg, gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

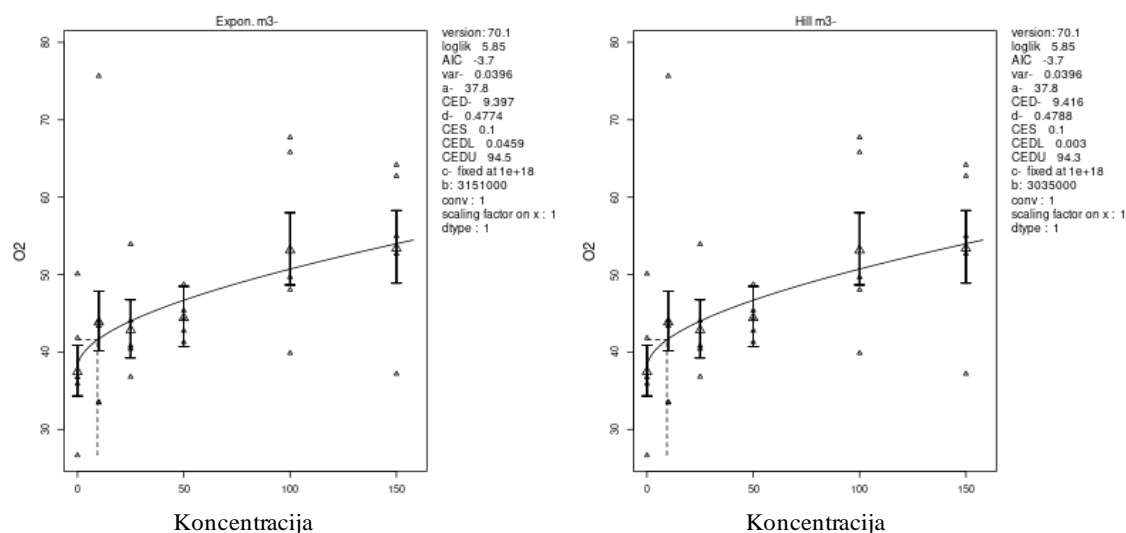
4.4.5.1 Odnos doze i efekta fluorida na parametre redoks statusa u mozgu

Potvrđena je dozna zavisnost u tkivu mozga za efekat F⁻ na povećanje nivoa O₂⁻ i MDA i na smanjenje nivoa SH grupa (Slike 64-67). Izračunate su CEDL koncentracije F⁻ 0,0 mg/kg za efekat povećanja nivoa O₂⁻, 0,1 mg/kg za efekat povećanja nivoa MDA i 12,0 mg/kg odnosno 0,0 mg/kg za efekat smanjenja nivoa SH grupa (Tabela 10).

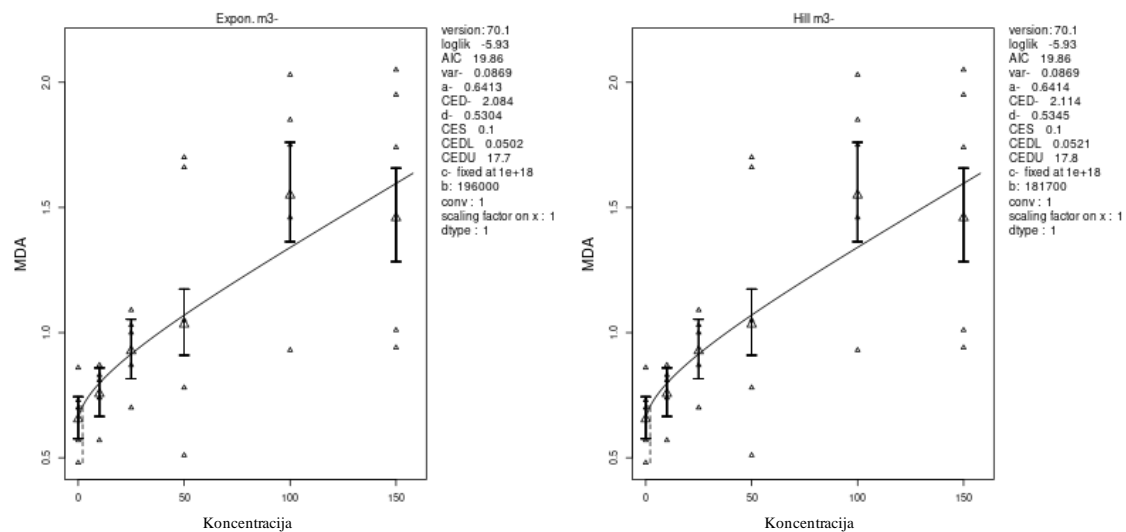
Tabela 10. Parametri modela za efekat fluorida na biomarkere redoks statusa u mozgu pacova.

Biomarker	CED	CEDL	CEDU	D-E trend	Model
	mg/kg F ⁻				
Eksterne koncentracije					
O ₂ ⁻	9,4	0,1	94,5	da↑	Expon. m3-
	9,4	0,003	94,3		Hill m3-
MDA	2,1	0,1	17,7	da↑	Expon. m3-
	2,1	0,1	17,8		Hill m3-
SH	25,6	12,0	35,3	da↓	Expon. m5-
Interne koncentracije					
SH	1,0	0,6	1,3	da ↓	Expon. m5-
	0,5	0,5	1,6		Hill m3-

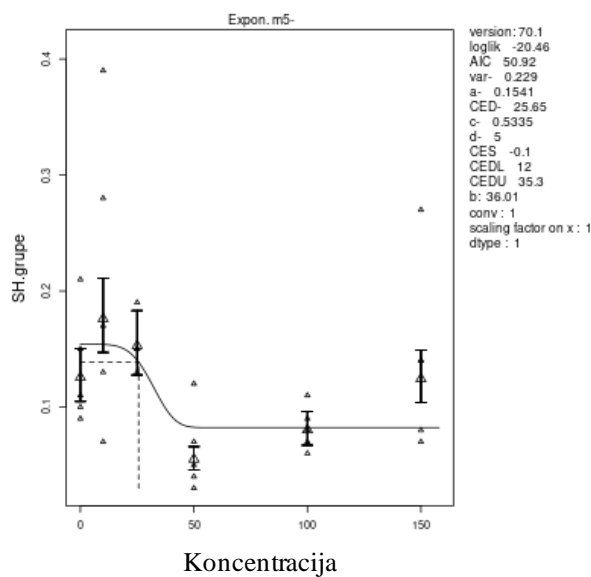
D-E doza efekat



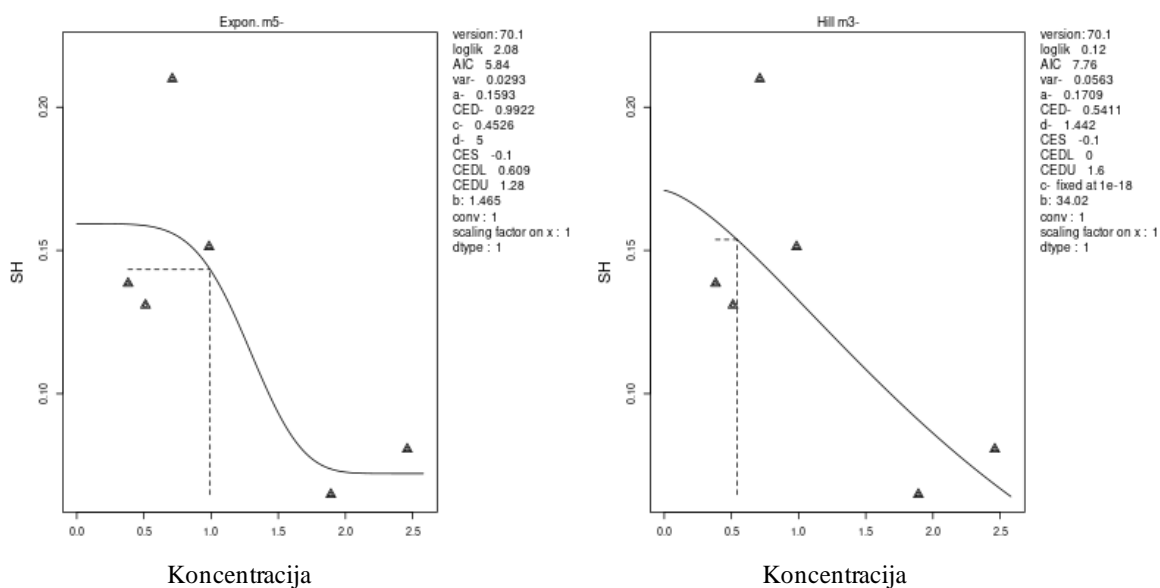
Slika 64. Efekat fluorida na prooksidativni biomarker oksidativnog oštećenja O_2^- u mozgu pacova.



Slika 65. Efekat fluorida na prooksidativni biomarker oksidativnog oštećenja MDA u mozgu pacova.



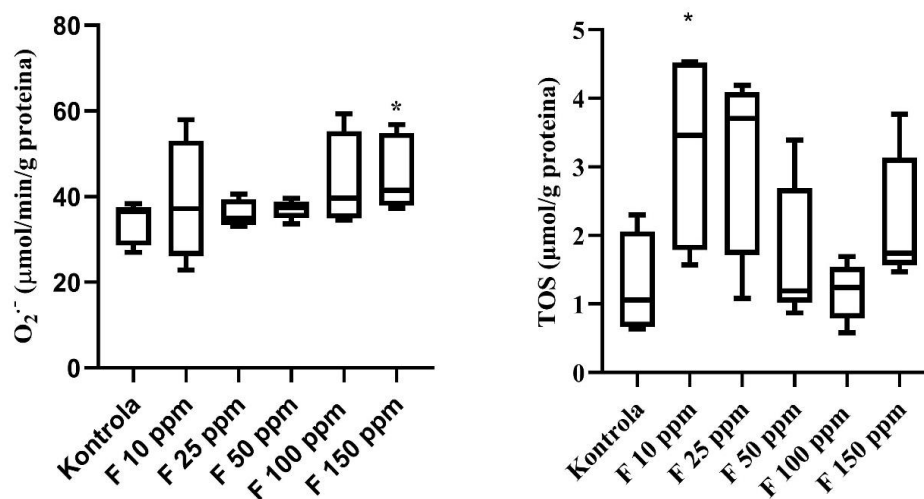
Slika 66. Efekat fluorida na SH grupe u mozgu pacova.



Slika 67. Efekat fluorida na SH grupe u mozgu pacova.

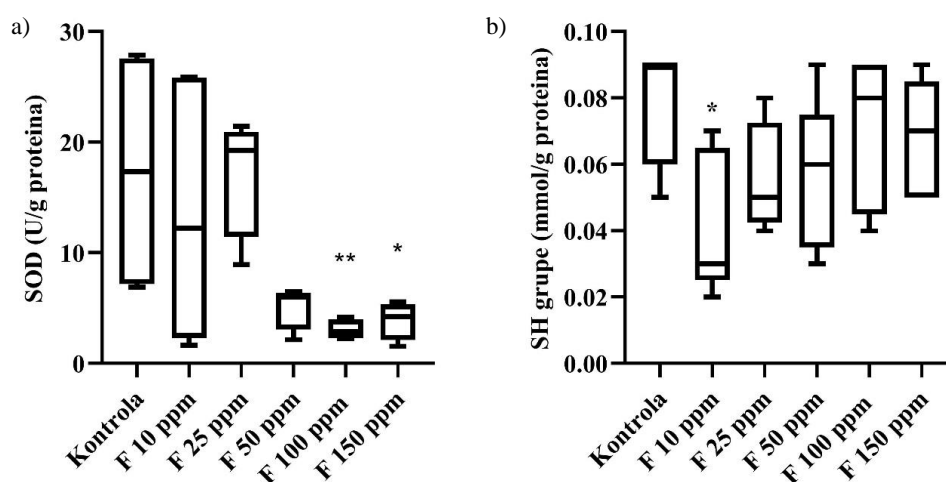
4.4.6 Uticaj fluorida na redoks status u testisima pacova

U tkivu testisa pacova koji su pili vodu sa 150 mg/l F⁻, uočen je značajno povišen nivo O₂⁻ (* p < 0,05) (Slika 68a). U testisima pacova koji su pili vodu sa 10 mg/l F⁻ zabeležene su značajno povišene vrednosti TOS (Slika 68b).



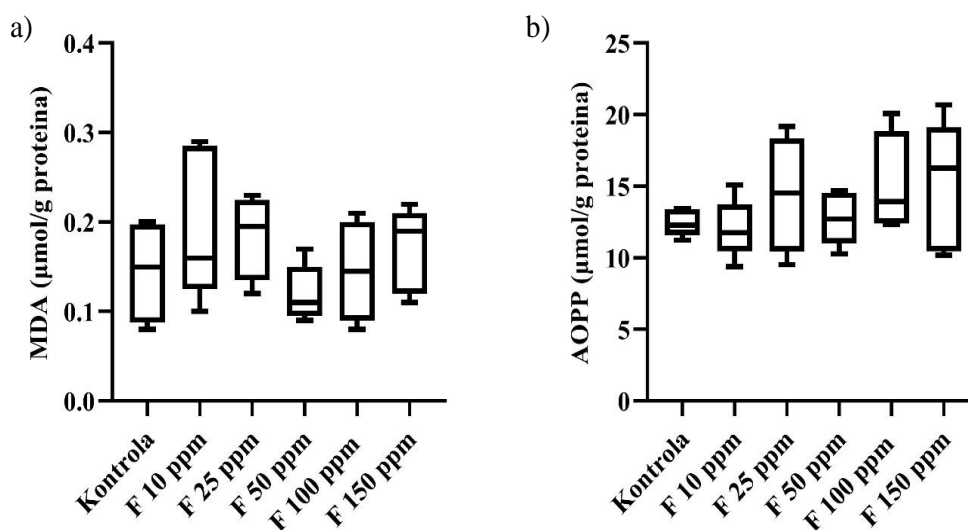
Slika 68. Prooksidativni biomarkeri u testisima mužjaka *Wistar* pacova nakon subakutne ekspozicije različitim koncentracijama fluorida: a) superoksidni anjon (O₂⁻) i b) totalni oksidativni status (TOS). * p < 0,05 (u poređenju sa kontrolnom grupom). *One-way ANOVA/Fisher LSD test i Kruskal-Wallis/Dun post-hoc test.* *Box* predstavlja interkvartilni opseg, gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

Zatim, u tkivu testisa pacova grupa F 100 ppm i F 150 ppm, aktivnosti SOD1 biomarkera su značajno snižene (* p < 0,05; ** p < 0,01) (Slika 69a). U grupi F 10 ppm, uočen je statistički značajno snižen nivo SH grupe (* p < 0,05) (Slika 69b).



Slika 69. Antioksidativni biomarkeri u testisima mužjaka *Wistar* pacova nakon subakutne ekspozicije različitim koncentracijama fluorida: a) aktivnost superoksid dismutaze (SOD1) i b) ukupne sulfhidrilne grupe (SH). *One-way ANOVA/Fisher LSD test i Kruskal-Wallis/Dun post-hoc test.* * p < 0,05; ** p < 0,01 (u poređenju sa kontrolnom grupom). *Box* predstavlja interkvartilni opseg gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

Vrednosti MDA i AOPP biomarkera u testisima pacova svih doznih grupa se statistički značajno ne razlikuju (Slika 70).



Slika 70. Biomarkeri oksidativnog oštećenja u testisima mužjaka *Wistar* pacova nakon subakutne ekspozicije različitim koncentracijama fluorida: a) malondialdehid (MDA) i b) uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP). *One-way* ANOVA/*Fisher* LSD test i *Kruskal-Wallis*/*Dun post-hoc* test. *Box* predstavlja interkvartilni opseg gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

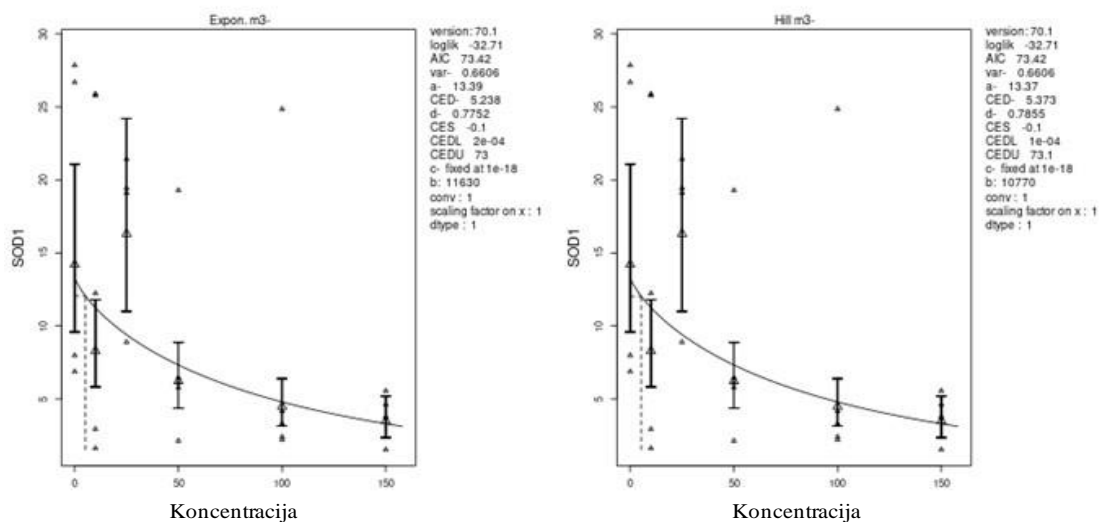
4.4.6.1 Odnos doze i efekta fluorida na parametre redoks statusa u testisima

Potvrđena je dozna zavisnost u tkivu testisa za efekat na F^- na smanjenje SOD1 aktivnosti i nivoa TOS biomarkera (Slike 71-73). Izračunate su CEDL koncentracije F^- $2e-04$ mg/kg i $0,0$ mg/kg za efekat smanjenja SOD1 aktivnosti i $0,2$ mg/kg za smanjenje nivoa TOS (Tabela 11).

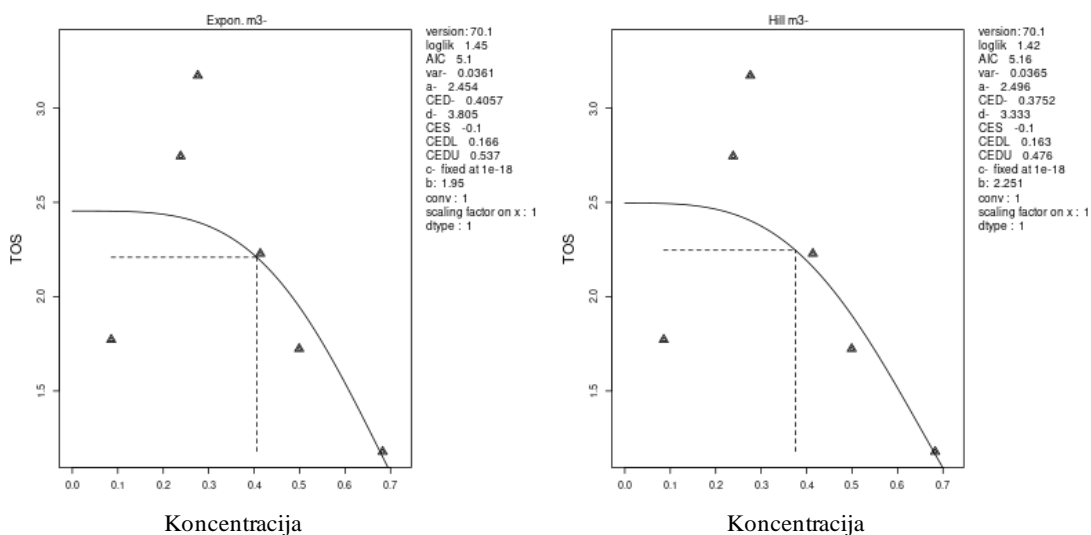
Tabela 11. Parametri modela za efekat fluorida na biomarkere redoks statusa u testisima pacova.

Biomarker	CED	CEDL	CEDU	D-E trend	Model
	mg/kg F^-				
Eksterne koncentracije					
SOD1	5,2	$2e-04$	73,0	da↓	Expon. m3- Hill m3-
	5,4	$1e-04$	73,1		
Interne koncentracije					
SOD1	0,1	0,07	0,3	da ↓	Expon. m5- Hill m3-
	0,1	0,07	0,3		
TOS	0,4	0,2	0,5	da ↓	Expon. m3- Hill m3-
	0,4	0,2	0,5		

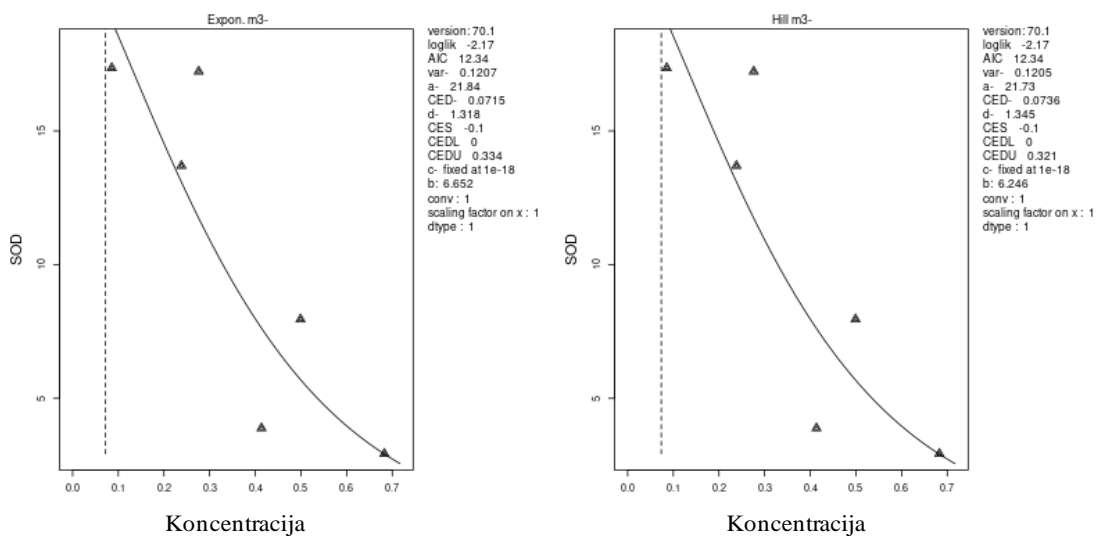
D-E doza efekat



Slika 71. Efekat fluorida na antioksidativni biomarker SOD1 u testisima pacova.



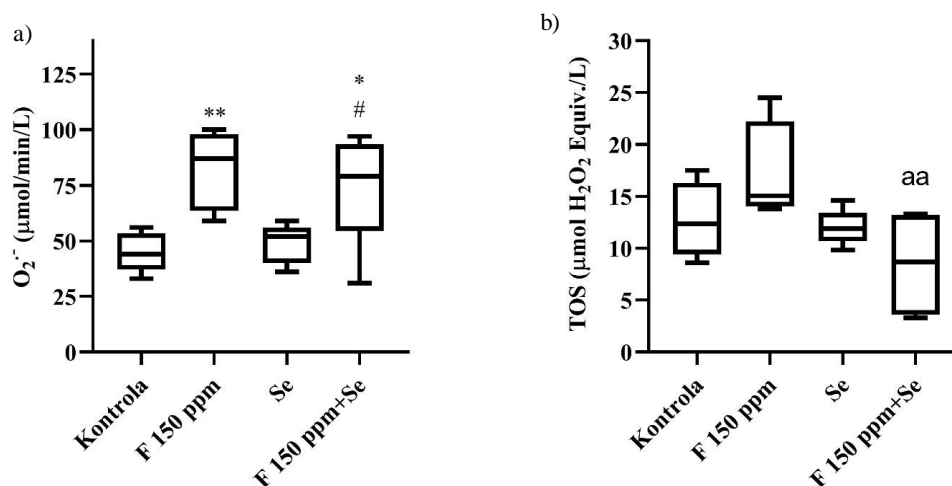
Slika 72. Efekat fluorida na prooksidativni biomarker TOS u testisima pacova.



Slika 73. Efekat fluorida na antioksidativni biomarker SOD1 u testisima pacova.

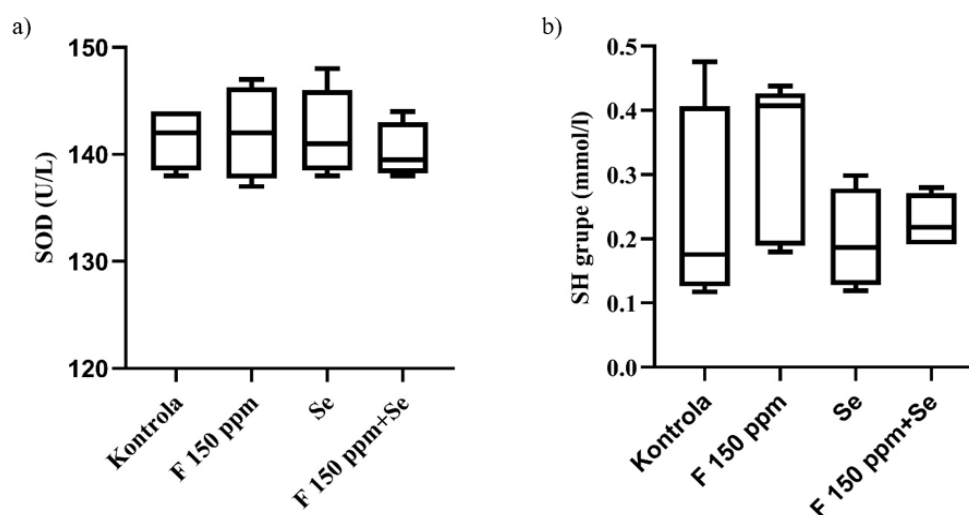
4.4.7 Uticaj suplementacije selenom na redoks status u plazmi pacova

U plazmi pacova koju su pili vodu sa Se i F, uočen je značajno povišen nivo $O_2^{\cdot-}$ (*# $p < 0,05$) (Slika 74a). Nivo TOS u grupi F 150 ppm+Se značajno je niži u odnosu na F 150 ppm grupu (^{aa} $p < 0,01$) (Slika 74b).



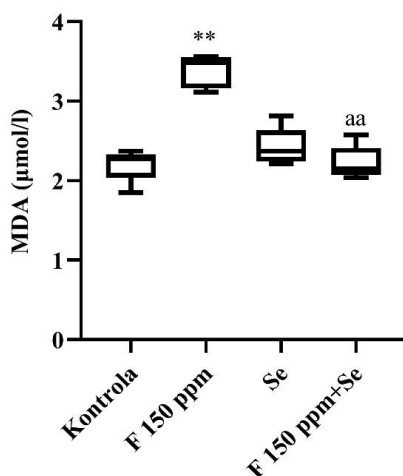
Slika 74. Prooksidativni biomarkeri u plazmi mužjaka *Wistar* pacova nakon suplementacije selenom. Natrijum-fluorid 150 mg/l (F 150 ppm); natrijum-selenit 1,5 mg/l (Se). a) superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$) i b) totalni oksidativni status (TOS). * # $p < 0,05$ ** aa $p < 0,01$. * u poređenju sa kontrolnom grupom, # u poređenju sa Se grupom, ^a u poređenju sa F 150 ppm grupom. *One-way ANOVA/Fisher LSD* test i *Kruskal-Wallis/Dun post-hoc* test. *Box* predstavlja interkvartilni opseg gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

Aktivnost SOD1 i nivoi SH grupa se ne razlikuju značajno među eksperimentalnim grupama (Slika 75).



Slika 75. Antioksidativni biomarkeri u plazmi mužjaka *Wistar* pacova nakon suplementacije selenom. Natrijum-fluorid 150 mg/l (F 150 ppm); natrijum-selenit 1,5 mg/l (Se). a) aktivnost superoksid dismutaze (SOD1) i b) ukupne sulfhidrilne grupe (SH). *One-way ANOVA/Fisher LSD* test i *Kruskal-Wallis/Dun post-hoc* test. *Box* predstavlja interkvartilni opseg gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

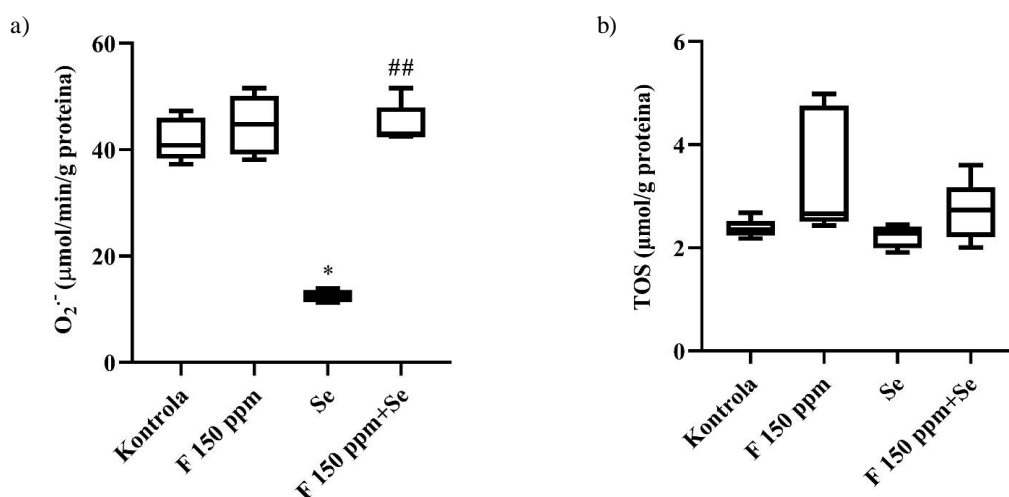
U plazmi pacova grupe F 150 ppm uočen je značajno povišen nivo MDA (** p < 0,01). U grupi F 150 ppm+Se, MDA je značajno snižen u poređenju sa F 150 ppm grupom (^{aa} p < 0,01) (Slika 76).



Slika 76. Antioksidativni biomarkeri u plazmi mužjaka *Wistar* pacova nakon suplementacije selenom. Natrijum-fluorid 150 mg/l (F 150 ppm); natrijum-selenit 1,5 mg/l (Se). Malondialdehid (MDA). ** ^{aa} p < 0,01. * u poređenju sa kontrolnom grupom, ^a u poređenju sa F 150 ppm grupom. *One-way ANOVA/Fisher LSD test i Kruskal-Walis/Dun post-hoc test.* *Box* predstavlja interkvartilni opseg gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

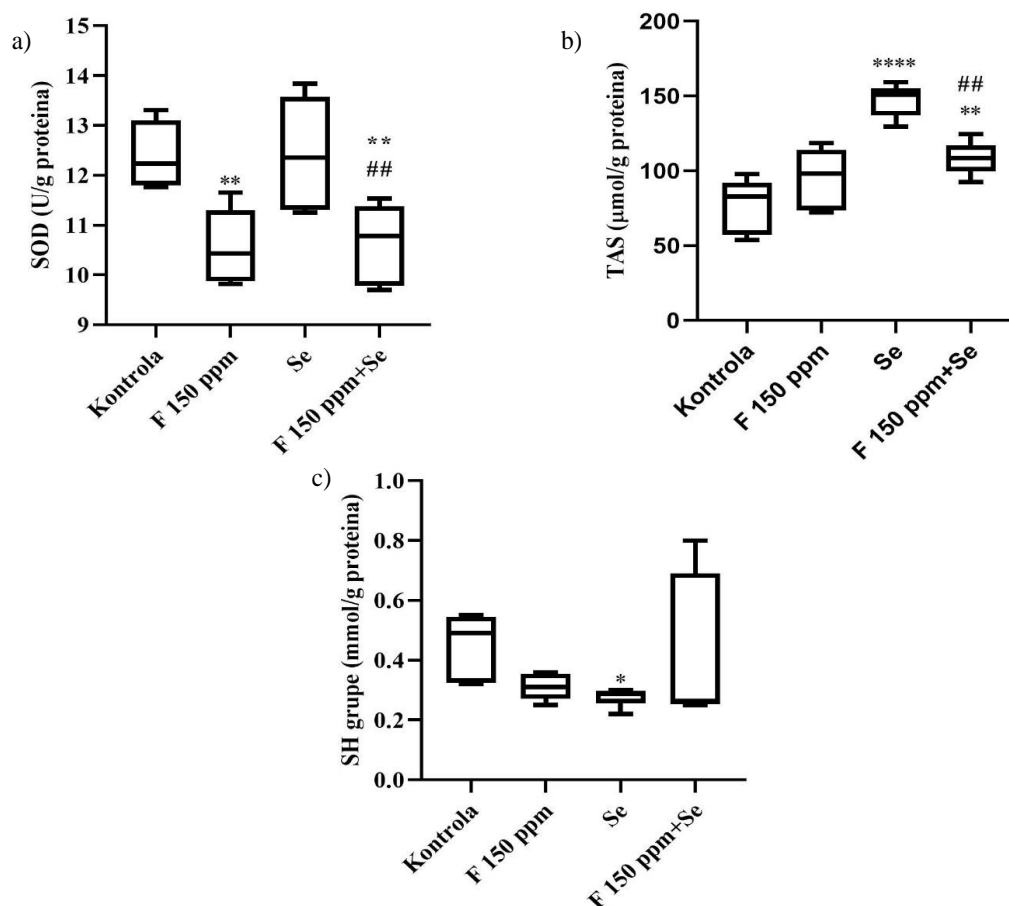
4.4.8 Uticaj suplementacije selenom na redoks status u jetri pacova

Nivo $O_2^{\cdot-}$ u jetri pacova koji su pili vodu sa Se je značajno snižen (* p < 0,05), dok se TOS ne razlikuje značajno među grupama (Slika 77).



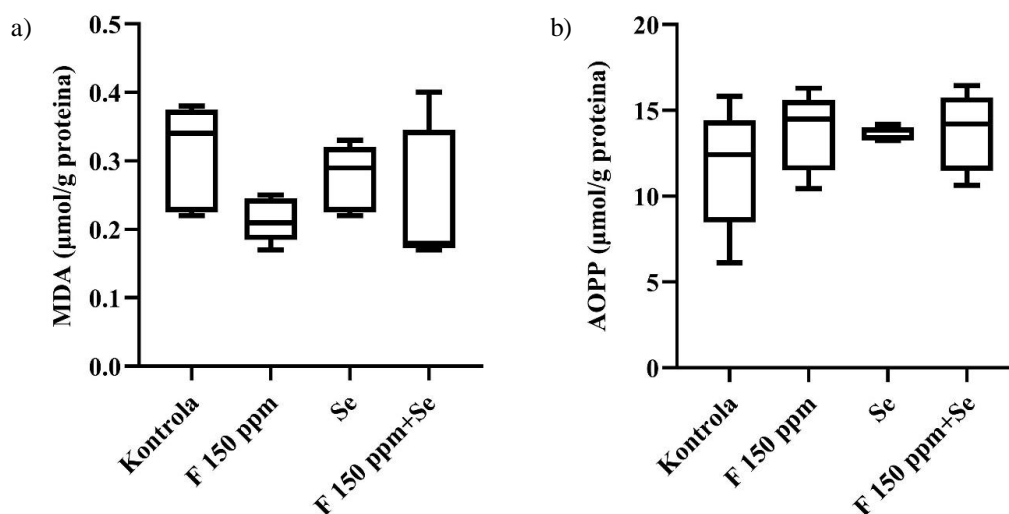
Slika 77. Prooksidativni biomarkeri u jetri mužjaka *Wistar* pacova nakon suplementacije selenom. Natrijum-fluorid 150 mg/l (F 150 ppm); natrijum-selenit 1,5 mg/l (Se). a) superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$) i b) totalni oksidativni status (TOS). * p < 0,05; ## p < 0,01. * u poređenju sa kontrolnom grupom, # u poređenju sa Se grupom. *One-way ANOVA/Fisher LSD test i Kruskal-Walis/Dun post-hoc test.* *Box* predstavlja interkvartilni opseg gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

U jetri pacova koji su pili vodu sa F⁻ i kombinacijom F⁻ i Se, uočen ja značajan pad aktivnosti SOD1 ($p < 0,01$) (Slika 78a). Vrednosti TAS biomarkera u jetri pacova grupa Se i F 150 ppm+Se su značajno povišene ($p < 0,01$; $p < 0,0001$) (Slika 78b). U Se grupi uočen je značajan pad nivoa SH grupa ($p < 0,05$) (Slika 78c).



Slika 78. Antioksidativni biomarkeri u jetri mužjaka *Wistar* pacova nakon suplementacije selenom. Natrijum-fluorid 150 mg/l (F 150 ppm); natrijum-selenit 1,5 mg/l (Se). a) aktivnost superoksid dismutaze (SOD1), b) totalni antioksidativni status (TOS) i c) ukupne sulfhidrilne grupe (SH). * $p < 0,05$; ** ## $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. * u poređenju sa kontrolnom grupom, # u poređenju sa Se grupom. *One-way ANOVA/Fisher LSD test* i *Kruskal-Walis/Dun post-hoc test*. *Box* predstavlja interkvartilni opseg gornje i donje vertikalne linije predstavlja minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu

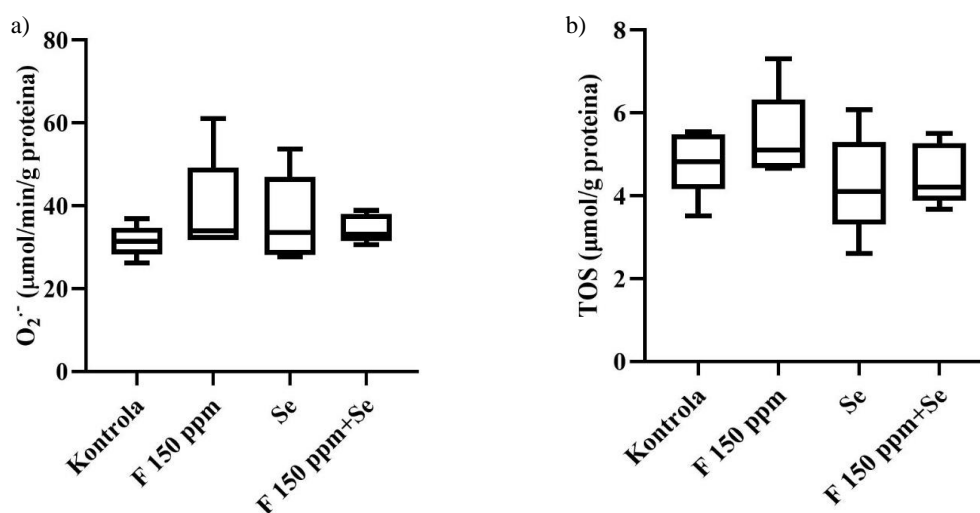
Istraživanjem je ustanovljeno da se nivoi MDA i AOPP u jetri ne razlikuju značajno među grupama (Slika 79).



Slika 79. Biomarkeri oksidativnog oštećenja u jetri mužjaka *Wistar* pacova nakon suplementacije selenom: a) malondialdehid (MDA) i b) uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP). *One-way ANOVA/Fisher LSD test i Kruskal-Walis/Dun post-hoc test*. *Box* predstavlja interkvartilni opseg gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

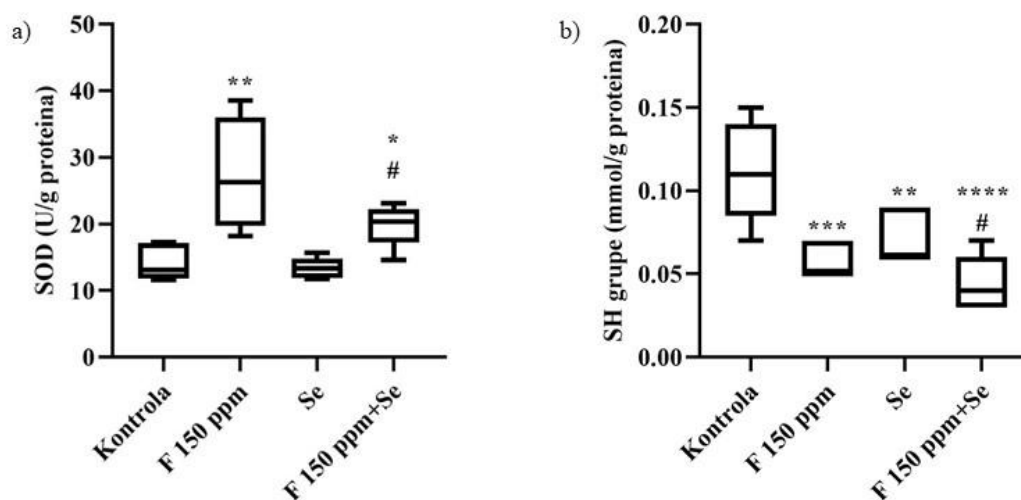
4.4.9 Uticaj suplementacije selenom na redoks status u bubrezima pacova

U bubrezima pacova koji su pili vodu sa F⁻ i/ili Se, nivoi O₂⁻ i TOS se ne razlikuju značajno između grupa (Slika 80 a i b).



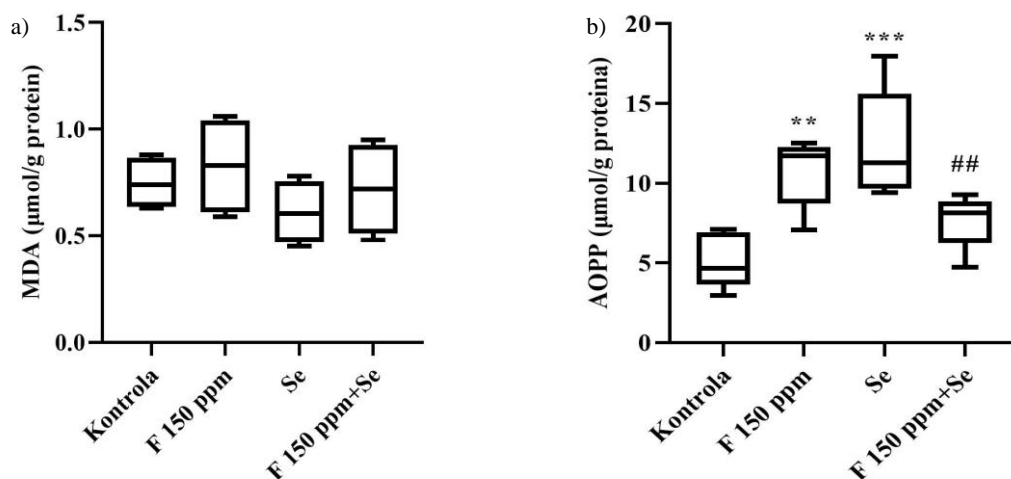
Slika 80. Prooksidativni biomarkeri u bubrezima mužjaka *Wistar* pacova nakon suplementacije selenom. Natrijum-fluorid 150 mg/l (F 150 ppm); natrijum-selenit 1,5 mg/l (Se). a) superoksidni anjon (O₂⁻) i b) totalni oksidativni status (TOS). *One-way ANOVA/Fisher LSD test i Kruskal-Walis/Dun post-hoc test*. *Box* predstavlja interkvartilni opseg gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

Zatim, analizom je uočena značajna povišena aktivnost SOD1 u grupama F 150 ppm i F 150 ppm+Se u bubrezima pacova (* # $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) (Slika 81a). Vrednosti SH grupa su značajno snižene u svim grupama pacova koji su pili vodu sa F⁻ i/ili Se (Slika 81b).



Slika 81. Antioksidativni biomarkeri u bubrezima mužjaka *Wistar* pacova nakon suplementacije selenom. Natrijum-fluorid 150 mg/l (F 150 ppm); natrijum-selenit 1,5 mg/l (Se). a) aktivnost superoksid dismutaze (SOD1) i b) ukupne sulfhidrilne grupe (SH). * # $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. * u poređenju sa kontrolnom grupom; # u poređenju sa Se grupom. *One-way ANOVA/Fisher LSD test* i *Kruskal-Walis/Dun post-hoc test*. *Box* predstavlja interkvartilni opseg gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

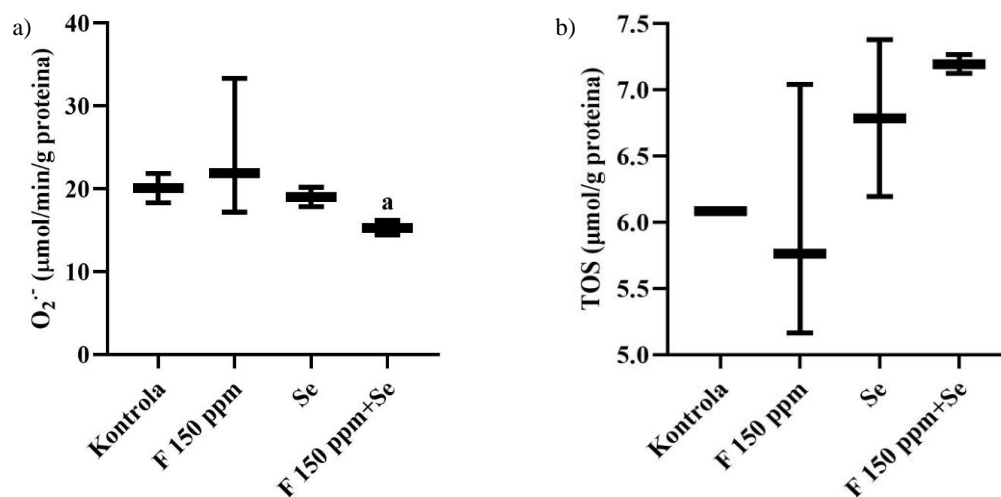
U bubrezima pacova svih grupa nije zabeležena značajna promena nivoa MDA (Slika 82a). Vrednosti AOPP biomarkera su značajno povišene u grupama sa F⁻ i/ili Se (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (Slika 82b).



Slika 82. Biomarkeri oksidativnog oštećenja u bubrezima mužjaka *Wistar* pacova nakon suplementacije selenom. Natrijum-fluorid 150 mg/l (F 150 ppm); natrijum-selenit 1,5 mg/l (Se): a) malondialdehid (MDA) i b) uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP). *One-way ANOVA/Fisher LSD test* i *Kruskal-Walis/Dun post-hoc test*. ** ## $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. * u poređenju sa kontrolnom grupom; # u poređenju sa Se grupom. *Box* predstavlja interkvartilni opseg gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

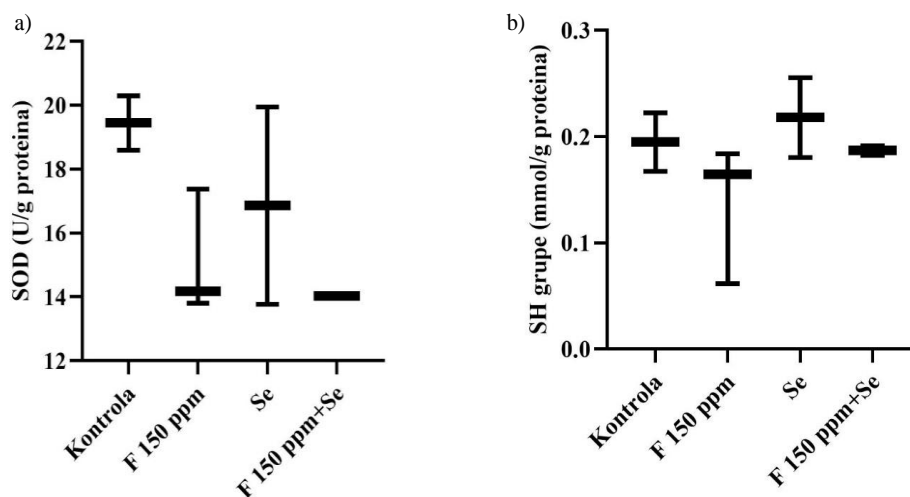
4.4.10 Uticaj suplementacije selenom na redoks status u slezini pacova

U slezini grupe F 150 ppm+Se, uočen je značajno niži nivo $O_2^{\cdot-}$ u poređenju sa F 150 ppm grupom (^a $p < 0,05$) (Slika 83a). Zatim, u slezini nisu uočene značajne promene nivoa TOS svih grupa (Slika 83b).



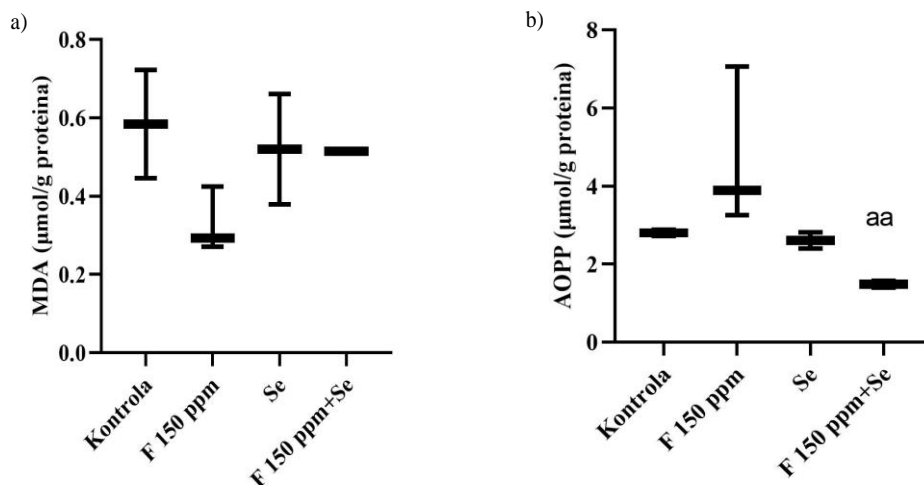
Slika 83. Prooksidativni biomarkeri u slezini mužjaka *Wistar* pacova nakon suplementacije selenom. Natrijum-fluorid 150 mg/l (F 150 ppm); natrijum-selenit 1,5 mg/l (Se). a) superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$) i b) totalni oksidativni status (TOS). *One-way ANOVA/Fisher LSD test* i *Kruskal-Walis/Dun post-hoc test*. *Box* predstavlja interkvartilni opseg gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

U slezini pacova koji su pili vodu sa F^- i/ili Se nisu uočene značajne promene SOD1 aktivnosti i nivoa SH grupa (Slika 84).



Slika 84. Antioksidativni biomarkeri u slezini mužjaka *Wistar* pacova nakon suplementacije selenom. Natrijum-fluorid 150 mg/l (F 150 ppm); natrijum-selenit 1,5 mg/l (Se). a) aktivnost superoksid dismutaze (SOD1) i b) ukupne sulfhidrilne grupe (SH). *One-way ANOVA/Fisher LSD test* i *Kruskal-Walis/Dun post-hoc test*. *Box* predstavlja interkvartilni opseg gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

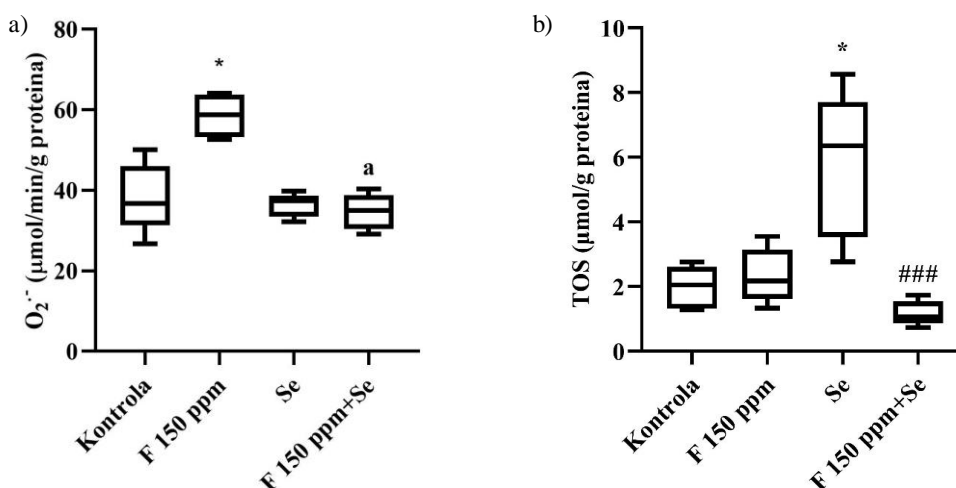
Zatim, u slezini nisu uočene značajne promene nivoa MDA svih grupa (Slika 85a). U grupi F 150 ppm+Se zabeležen je značajno niži nivo AOPP biomarkera, u poređenju sa F 150 ppm grupom ($p < 0,01$) (Slika 85b).



Slika 85. Biomarkeri oksidativnog oštećenja u slezini mužjaka *Wistar* pacova nakon suplementacije selenom. Natrijum-fluorid 150 mg/l (F 150 ppm); natrijum-selenit 1,5 mg/l (Se). a) malondialdehid (MDA) i b) uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP). *One-way ANOVA/Fisher LSD test* i *Kruskal-Walis/Dun post-hoc test*. ^{aa} $p < 0,01$ (u poređenju sa F 150 ppm grupom). *Box* predstavlja interkvartilni opseg gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

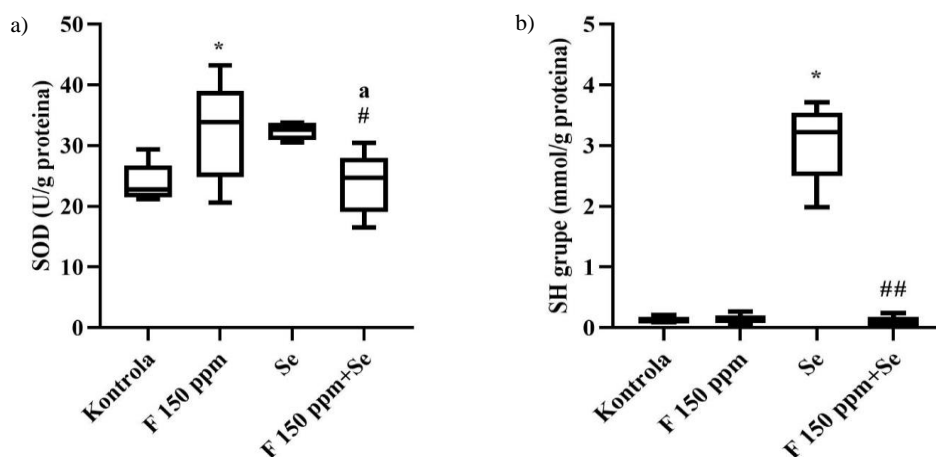
4.4.11 Uticaj suplementacije selenom na redoks status u mozgu pacova

Vrednosti O_2^- u mozgu pacova grupe F 150 ppm su značajno povišene ($p < 0,05$), dok je nivo O_2^- u grupi F 150+Se je značajno snižen u poređenju sa F 150 ppm grupom (^a $p < 0,05$) (Slika 86a). Nivo TOS je značajno povišen u Se grupi ($* p < 0,05$) (Slika 86b).



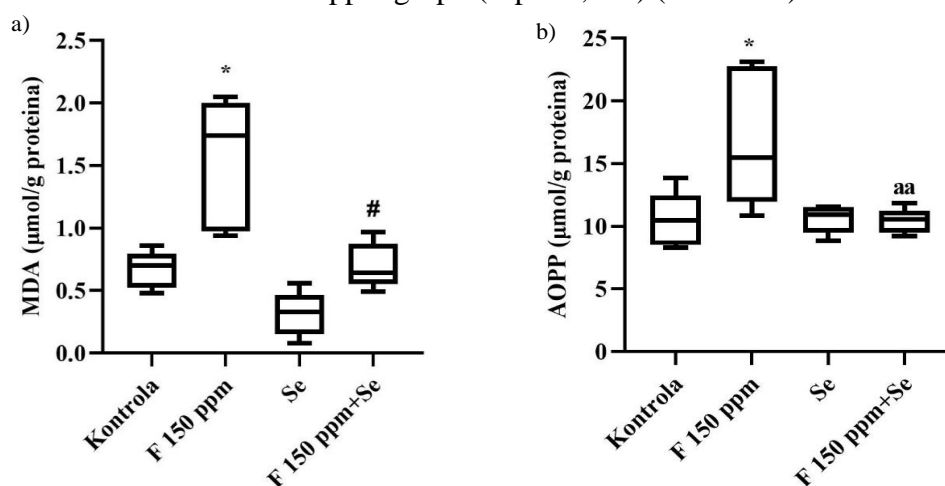
Slika 86. Prooksidativni biomarkeri u mozgu mužjaka *Wistar* pacova nakon suplementacije selenom. Natrijum-fluorid 150 mg/l (F 150 ppm); natrijum-selenit 1,5 mg/l (Se). a) superoksidni anjon (O_2^-) i b) totalni oksidativni status (TOS). *One-way ANOVA/Fisher LSD test* i *Kruskal-Walis/Dun post-hoc test*. ^a $p < 0,05$; ^{###} $p < 0,001$. * u poređenju sa kontrolnom grupom, # u poređenju sa Se grupom. *Box* predstavlja interkvartilni opseg gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

U tkivu mozga pacova grupe F 150 ppm zabeležena je povišena SOD1 aktivnost u odnosu na kontrolu, dok je u F 150 ppm+Se grupi zabeležena značajno manja aktivnost SOD1 u poređenju sa Se i F 150 ppm grupama ($p < 0,05$) (Slika 87a). Vrednosti SH grupa su značajno povišene u Se grupi ($* p < 0,05$) (Slika 87b).



Slika 87. Antioksidativni biomarkeri u mozgu mužjaka *Wistar* pacova nakon suplementacije selenom. Natrijum-fluorid 150 mg/l (F 150 ppm); natrijum-selenit 1,5 mg/l (Se). a) aktivnost superoksid dismutaze (SOD1) i b) ukupne sulfhidrilne grupe (SH). *One-way ANOVA/Fisher LSD test* i *Kruskal-Wallis/Dun post-hoc test*. * a# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$. * u poređenju sa kontrolnom grupom, # u poređenju sa Se grupom. *Box* predstavlja interkvartilni opseg gornje i donje vertikalne linije predstavlja minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

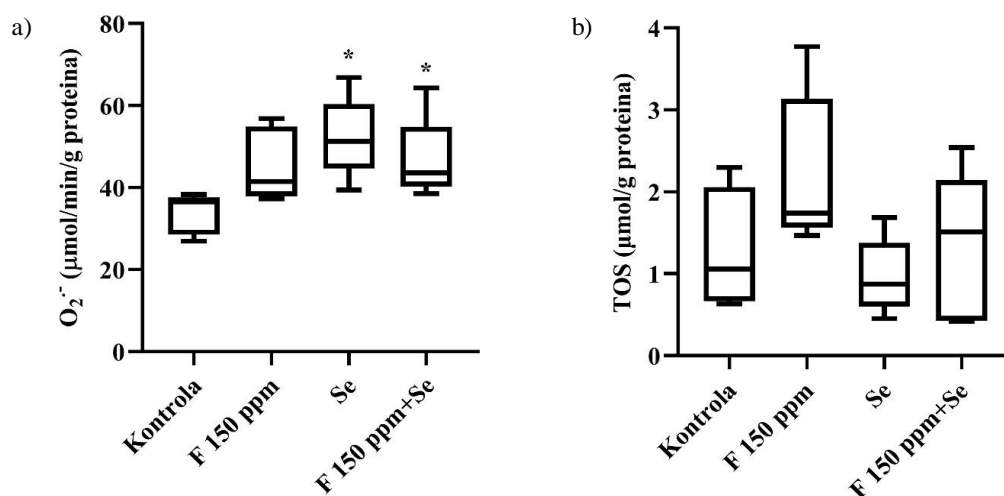
Zatim, u grupi F 150 ppm, zabeležen je značajno povišen nivo MDA, dok u grupi F 150 ppm+Se nisu uočene značajne promene MDA u mozgu pacova (Slika 88a). U grupi F 150 ppm nivo AOPP je značajno povišen ($* p < 0,05$) u odnosu na kontrolu, a u grupi F 150 ppm+Se, nivo AOPP je značajno snižen u odnosu na F 150 ppm grupu ($^{aa} p < 0,001$) (Slika 88b).



Slika 88. Biomarkeri oksidativnog oštećenja u mozgu mužjaka *Wistar* pacova nakon suplementacije selenom. Natrijum-fluorid 150 mg/l (F 150 ppm); natrijum-selenit 1,5 mg/l (Se). a) malondialdehid (MDA) i b) uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP). *One-way ANOVA/Fisher LSD test* i *Kruskal-Wallis/Dun post-hoc test*. * # $p < 0,01$; $^{aa} p < 0,001$. * u poređenju sa kontrolnom grupom; # u poređenju sa Se grupom; a u poređenju sa F 150 ppm grupom. *Box* predstavlja interkvartilni opseg gornje i donje vertikalne linije predstavlja minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

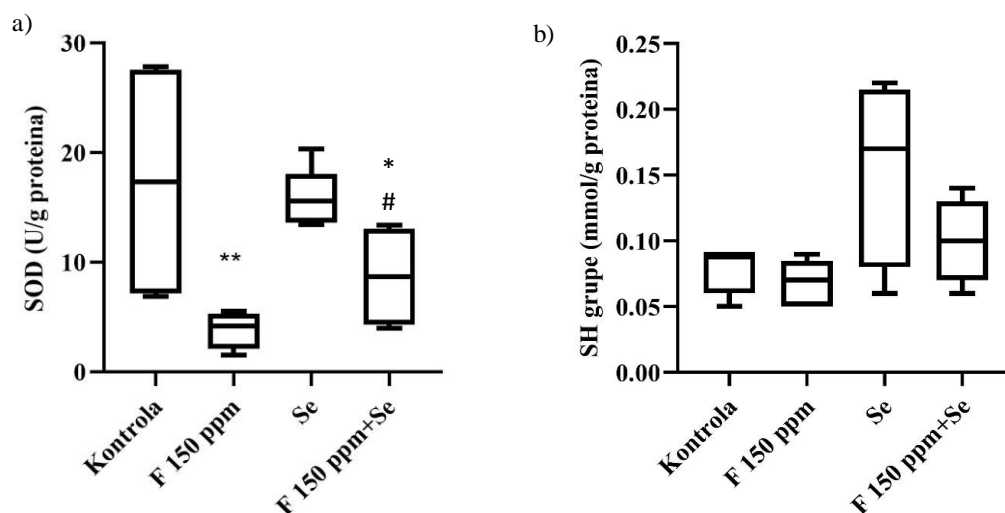
4.4.12 Uticaj suplementacije selenom na redoks status u testisima pacova

Vrednosti O_2^- su značajno povišene testisima pacova grupa Se i F 150 ppm+Se (* $p < 0,05$) (Slika 89a). Nisu uočene značajne promene TOS (Slika 89b).



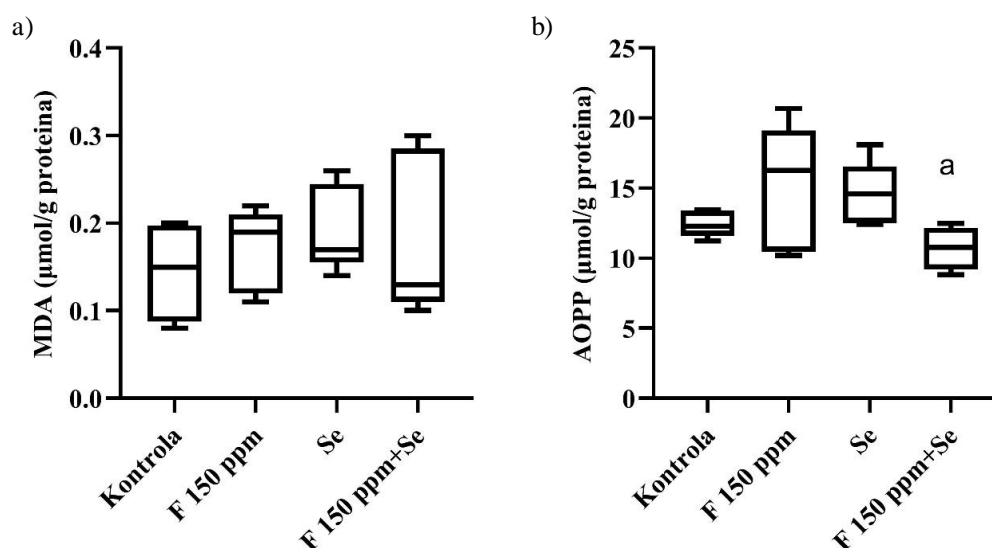
Slika 89. Prooksidativni biomarkeri u testisima mužjaka *Wistar* pacova nakon suplementacije selenom. Natrijum-fluorid 150 mg/l (F 150 ppm); natrijum-selenit 1,5 mg/l (Se). a) superoksidni anjon (O_2^-) i b) totalni oksidativni status (TOS). *One-way* ANOVA/*Fisher* LSD test i *Kruskal-Walis*/*Dun post-hoc* test. * $p < 0,05$. * u poređenju sa kontrolnom grupom. *Box* predstavlja interkvartilni opseg gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

U testisima pacova grupa F 150 ppm i F 150ppm+Se uočen je pad SOD1 aktivnosti ($p < 0,01$; $p < 0,05$) (Slika 90a). Analizom testisa nisu uočene značajne promene nivoa SH grupa (Slika 90b).



Slika 90. Antioksidativni biomarkeri u testisima mužjaka *Wistar* pacova nakon suplementacije selenom. Natrijum-fluorid 150 mg/l (F 150 ppm); natrijum-selenit 1,5 mg/l (Se). a) aktivnost superoksid dismutaze (SOD1) i b) ukupne sulfhidrilne grupe (SH). *One-way* ANOVA/*Fisher* LSD test i *Kruskal-Walis*/*Dun post-hoc* test. * # $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. * u poređenju sa kontrolnom grupom, # u poređenju sa Se grupom. *Box* predstavlja interkvartilni opseg gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

Zatim, istraživanjem nisu uočene značajne promene nivoa MDA u testisima pacova (Slika 91a). U grupi F 150 ppm+Se zabeležen je značajno niži nivo AOPP u odnosu na grupu F 150 ppm (^a $p < 0,05$) (Slika 91b).



Slika 91. Biomarkeri oksidativnog oštećenja u testisima mužjaka *Wistar* nakon suplementacije selenom. Natrijum-fluorid 150 mg/l (F 150 ppm); natrijum-selenit 1,5 mg/l (Se). a) malondialdehid (MDA) i b) uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP). *One-way ANOVA/Fisher LSD test* i *Kruskal-Wallis/Dun post-hoc test*. ^a $p < 0,05$. ^a u poređenju sa F 150 ppm grupom. *Box* predstavlja interkvartilni opseg gornje i donje vertikalne linije predstavljaju minimalnu i maksimalnu vrednost parametara unutar grupe, dok horizontalna linija unutar *box*-a predstavlja medijanu.

4.5 Koncentracije bioelemenata kod *Wistar* pacova

4.5.1 Uticaj fluorida na bioelemente eksperimentalnih životinja

4.5.1.1 Koncentracije bioelemenata u mekim tkivima

U Tabeli 12 su prikazane koncentracije Cu, Zn, Fe i Mn u krvi, jetri, slezini, bubrezima, mozgu i testisima *Wistar* pacova nakon subakutne izloženosti rastućim koncentracijama F⁻.

U krvi pacova, koncentracije Cu su značajno povišene u grupama pacova koji su pili vodu sa 10, 25, 100 i 150 mg/l F⁻ (* p < 0,05). Zatim, nisu uočene značajne promene koncentracija Zn, Fe i Mn u krvi pacova doznih grupa sa F⁻.

U tkivu jetre, koncentracije Cu su značajno snižene u grupama koje su pile vodu sa 100 i 150 mg/l F⁻ (* p < 0,05; ** p < 0,01). Koncentracije Zn u jetri su statistički značajno povišene u grupama koje su pile vodu sa 50 i 100 mg/l F⁻ (** p < 0,01, * p < 0,05). Nisu uočene značajne promene koncentracija Fe, dok su koncentracije Mn značajno povišene u grupama F 100 ppm i F 150 ppm (* p < 0,05).

U slezini je uočena značajna promena Zn u grupi koja je pila vodu sa 25 mg/l F⁻ (* p < 0,05). Nisu zabeležene značajne promene koncentracija Cu i Fe u slezini pacova svih doznih grupa sa F⁻. Koncentracija Mn je bila ispod limita detekcije.

Istraživanjem nisu uočene značajne promene koncentracija Cu u bubrezima pacova svih doznih grupa. Zatim, u bubrezima pacova koji su pili vodu sa 50, 100 i 150 mg/l F⁻ uočene su značajno snižene koncentracije Fe i Mn (* p < 0,05; ** p < 0,01). Koncentracije Zn su značajno povišene u grupi F 100 ppm (* p < 0,05).

Analizom tkiva mozga pacova, uočena je značajno smanjena koncentracija Cu u grupi F 10 ppm (** p < 0,01). Nisu uočene značajne promene Zn, dok je Fe značajno sniženo u grupi F 100 ppm (*** p < 0,001). Koncentracija Mn je bila ispod limita detekcije.

U testisima pacova koji su pili vodu sa 10 mg/l F⁻, uočene su značajno povišene koncentracije Cu i Fe (* p < 0,05). Zatim, koncentracije Zn su statistički značajno povišene u grupama koje su pile vodu sa 10 i 50 mg/l F⁻ (* p < 0,05). Koncentracija Mn je bila ispod limita detekcije.

Tabela 12. Prikaz koncentracija bioelemenata u tkivima *Wistar* pacova, nakon subakutne ekspozicije rastućim koncentracijama fluorida.

Uzorak	Bioelementi	Grupe					
		Kontrola	F 10 ppm	F 25 ppm	F 50 ppm	F 100 ppm	F 150 ppm
Krv	Cu (μmol/l)	22,05±4,97	32,12±7,99*	31,06±6,62*	29,92±6,46	31,58±6,68*	32,51±8,01*
	Zn (μmol/l)	59,72±14,30	104,60±61,91	106,90±24,71	76,19±51,35	88,00±38,96	89,83±37,19
	Fe (mmol/l)	4,89±2,01	7,07±2,61	9,05±3,52	7,14±5,42	5,88±3,08	5,40±4,47
	Mn (μmol/l)	35,75±18,67	31,74±20,19	35,66±13,80	54,79±31,68	45,41±22,87	56,14±13,95
Jetra	Cu (μg/g)	3,73 3,37-4,22	3,41 3,36-3,84	3,74 3,42-5,02	3,67 3,37-3,77	3,14* 2,99-3,34	2,99** 2,93-3,25
	Zn (μg/g)	29,86 28,79-31,93	31,18 29,96-31,84	30,29 29,73-33,41	39,57** 33,59-58,39	36,06* 31,93-40,54	31,75 30,97-54,93
	Fe (μg/g)	122,9±19,59	129,40±9,29	120,50±2,87	134,00±13,49	120,3±16,23	121,80±7,67
	Mn (μg/g)	3,09±0,95	3,12±0,82	3,48±1,30	4,15±0,71	4,40±0,59*	4,43±1,09*
Slezina	Cu (μg/g)	1,65±0,41	2,04±1,26	2,48±0,09	1,12±0,21	0,95±0,10	1,14±0,51
	Zn (μg/g)	34,55 34,30-34,80	43,81 28,24-59,38	74,08* 61,44-86,73	48,38 40,31-56,45	37,03 32,69-41,37	36,42 35,49-37,35
	Fe (μg/g)	239,50 175,7-303,3	258,50 238,3-278,8	520,20 513,6-526,9	319,8 280,9-358,8	284,6 278,1-291,0	250,6 215,80-285,30
Bubrezi	Cu (μg/g)	7,13±1,78	8,1±1,44	7,74±2,03	8,55±2,65	6,77±2,31	5,48±1,84
	Zn (μg/g)	113,40 74,5-143,9	141,8 85,27-159,90	138,7 69,43-225,80	199,70 152,1-343,3	510,1* 87,72-560,60	43,87 23,21-66,48
	Fe (μg/g)	85,65±15,70	91,06±11,95	74,87±18,26	65,57±7,21*	57,87±21,33**	35,96±4,07****
	Mn (μg/g)	20,59±5,73	20,63±5,88	15,34±8,46	9,73±6,30**	4,60±1,66***	2,87±3,73***
Mozak	Cu (μg/g)	2,38 1,99-3,81	0,75** 0,58-1,59	1,90 1,57-2,52	2,18 1,81-2,81	1,52 1,16-2,01	2,47 1,51-2,77
	Zn (μg/g)	20,08 13,12-38,46	14,94 8,01-25,04	14,64 11,41-23,29	13,81 12,04-22,45	14,59 11,82-17,62	12,18 8,30-17,03
	Fe (μg/g)	43,58 35,14-63,30	33,56 27,75-49,77	35,46 27,15-66,43	32,38 29,13-35,39	20,54*** 17,47-24,82	30,75 23,78-35,58
Testisi	Cu (μg/g)	1,67±0,49	2,14±0,29*	1,89±0,27	1,87±0,21	1,77±0,24	1,63±0,23
	Zn (μg/g)	22,97 19,14-30,13	30,54 25,38-34,24*	30,51 28,16-31,86	32,61 29,17-33,42*	27,60 26,66-28,49	26,10 25,08-28,98
	Fe (μg/g)	16,55 13,95-19,27	21,14* 17,68-22,27	19,99 16,81-25,29	20,46 20,21-23,98	17,93 16,01-20,82	19,02 15,19-48,32

Kontrola voda; F 10 ppm natrijum-fluorid 10 mg/l; F 25 ppm natrijum-fluorid 25 mg/l; F 50 ppm natrijum-fluorid 50 mg/l; F 100 ppm natrijum-fluorid 100 mg/l; F 150 ppm natrijum-fluorid 150 mg/l.* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 (u poređenju sa kontrolnom grupom). *One-way ANOVA/ Fisher LSD post-hoc test i Kruskal-Wallis /Dun post-hoc test.* Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± SD ili kao medijana i interkvartilni opseg.

4.5.1.2 Odnos doze i efekta fluorida na bioelemente u mekim tkivima

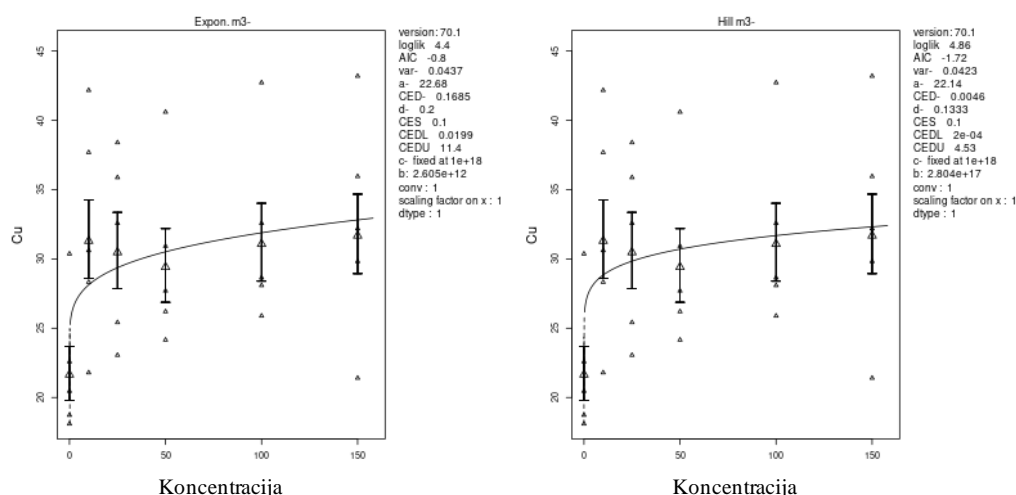
Dozno zavisan efekat F^- na koncentracije Cu, Zn, Mn i Fe potvrđen je u krvi, jetri, slezini, bubrezima, mozgu, femuru i zubima kod pacova. U testisima nisu dobijeni dozno zavisni efekti F^- niti za jedan bioelement.

Potvrđena je dozna zavisnost za efekat F^- na povećanje Cu u plazmi pacova (Slika 92). U Tabeli 13 su prikazane najniže doze kritičnog efekta fluorida (CED), zajedno sa graničnim vrednostima. Izračunata je najniža CEDL koncentracija F^- $2e-04$ mg/l za efekat povećanja koncentracija Cu.

Tabela 13. Parametri modela za efekat fluorida na bioelemente u krvi pacova.

Bioelement	CED	CEDL	CEDU	D-E trend	Model
	mg/l F^-				Expon. m3-
Cu	0,2	0,02	11,4	da↑	Expon. m3-
	0,0	$2e-04$	4,5		Hill m3-

D-E doza efekat



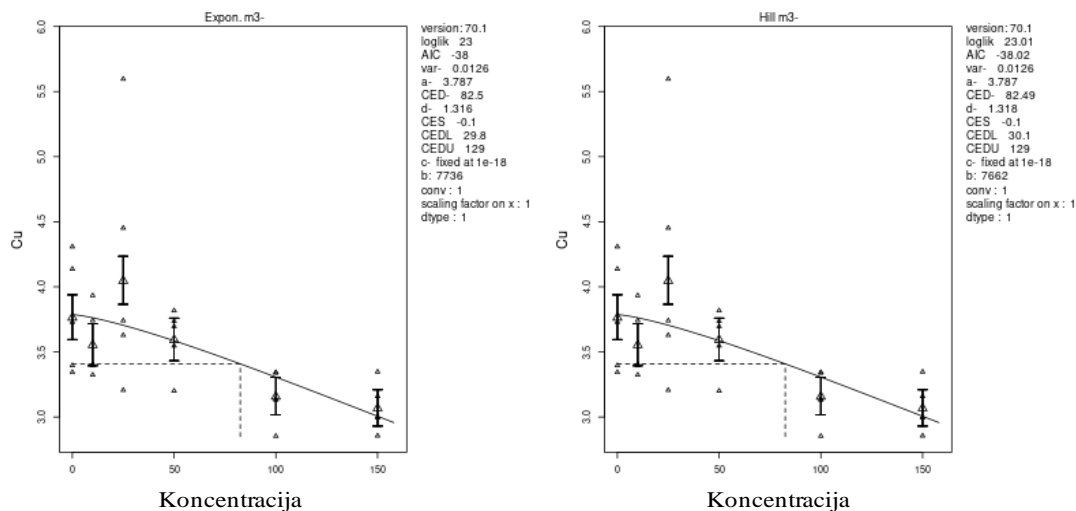
Slika 92. Efekat fluorida na koncentracije Cu u krvi pacova.

Potvrđena je dozna zavisnost u jetri za efekat F^- na smanjenje koncentracija Cu i povećanje koncentracija Mn i Zn (Slike 93-95). Izračunate su CEDL koncentracije F^- 29,8 mg/kg za efekat smanjenja koncentracija Cu, 0,0 za mg/kg efekat povećanja koncentracija Mn i 7,3 mg/kg za efekat povećanja koncentracija Zn (Tabela 14).

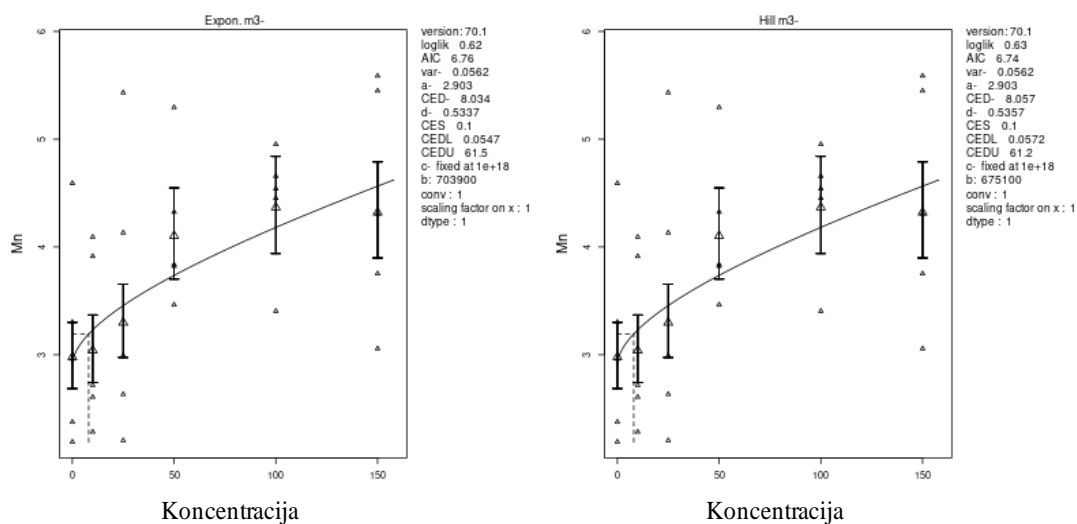
Tabela 14. Parametri modela za efekat fluorida na bioelemente u jetri pacova.

Bioelement	CED	CEDL	CEDU	D-E trend	Model
	mg/kg F^-				Expon. m3-
Cu	82,5	29,8	129,0	da↓	Expon. m3-
	82,5	30,1	129,0		Hill m3-
Mn	8,0	0,05	61,5	da↑	Expon. m3-
	8,1	0,1	61,2		Hill m3-
Zn	29,5	7,3	42,5	da↑	Expon. m5-

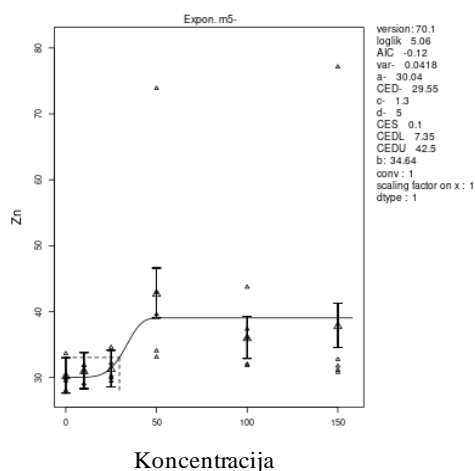
D-E doza efekat



Slika 93. Efekat fluorida na koncentracije Cu u jetri pacova.



Slika 94. Efekat fluorida na koncentracije Mn u jetri pacova.



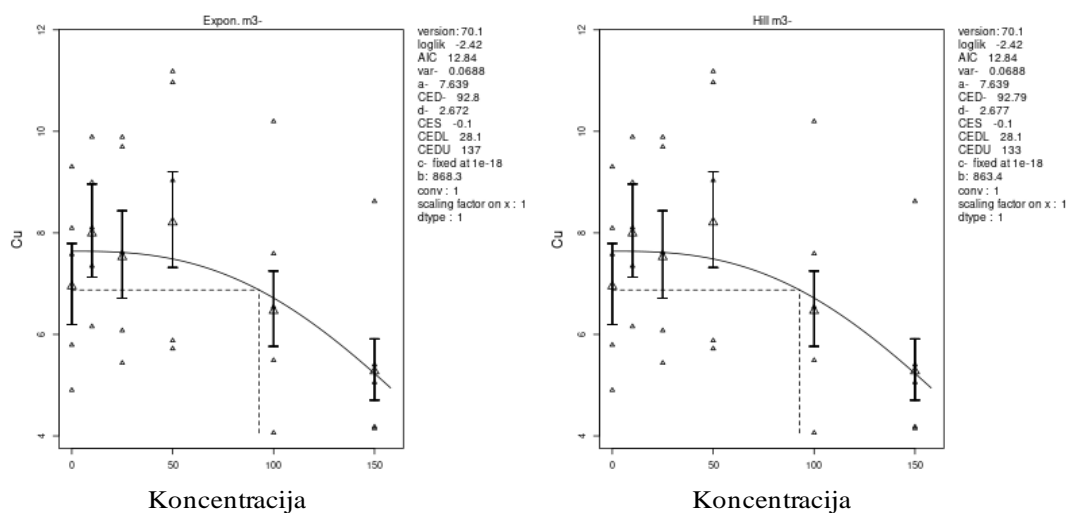
Slika 95. Efekat fluorida na koncentracije Zn u jetri pacova.

Potvrđena je dozna zavisnost efekta F^- na smanjenje koncentracija Cu, Mn, Fe i Zn i na povećanje koncentracija Cu i Zn u bubrežima (Slike 96-101). Izračunate su CEDL koncentracije fluorida 28,1 mg/kg za efekat smanjenja koncentracija Cu, 83,1 mg/kg za efekat smanjenja Mn, 7,4 mg/kg za efekat smanjenja Fe, 47,8 mg/kg za efekat smanjenja Zn, 0,0 mg/kg za efekat povećanja Cu i 2,48-06 mg/kg za povećanje koncentracija Zn u bubrežima (Tabela 15).

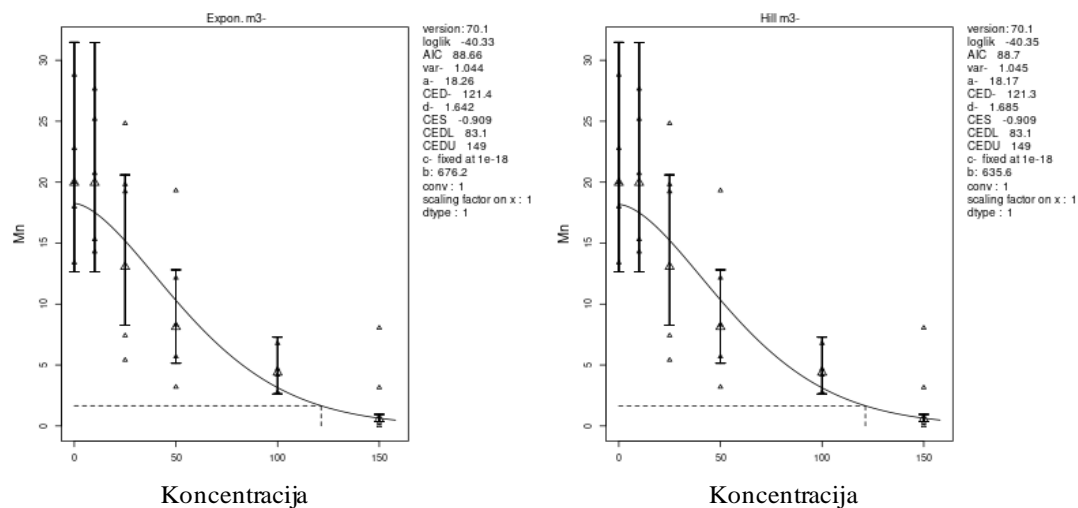
Tabela 15. Parametri modela za efekat fluorida na bioelemente u bubrežima pacova.

Bioelement	CED	CEDL	CEDU	D-E trend	Model
	mg/kg F^-				
Eksterna koncentracija					
Cu	92,8	28,1	137,0	da↓	Expon. m3-
	92,8	28,1	133,0		Hill m3-
Mn	121,4	83,1	149,0	da↓	Expon. m3-
	121,3	83,1	149,0		Hill m3-
Fe	25,7	7,4	58,8	da↓	Expon. m3-
	25,8	7,5	58,9		Hill m3-
Zn	90,9	63,2	104,0	da↓	Expon. m3-
	72,4	47,8	93,1		Hill m3-
Interna koncentracija					
Cu	1,4	1,3	1,8	da ↑	Expon. m5-
Zn	0,1	2,48e-06	0,6	da ↑	Expon. m3-
	0,1	0,05	0,6		Hill m3-

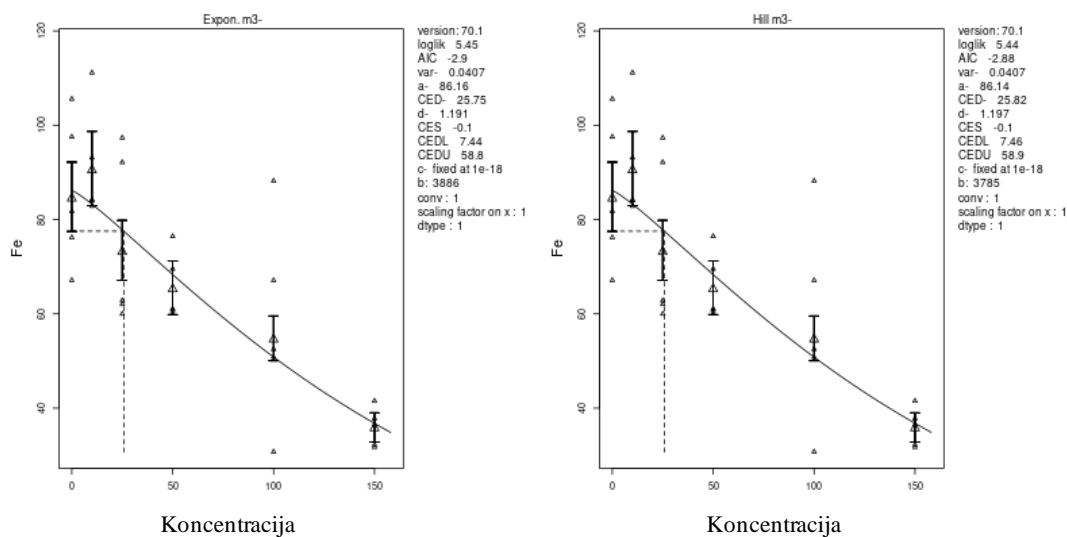
D-E doza efekat



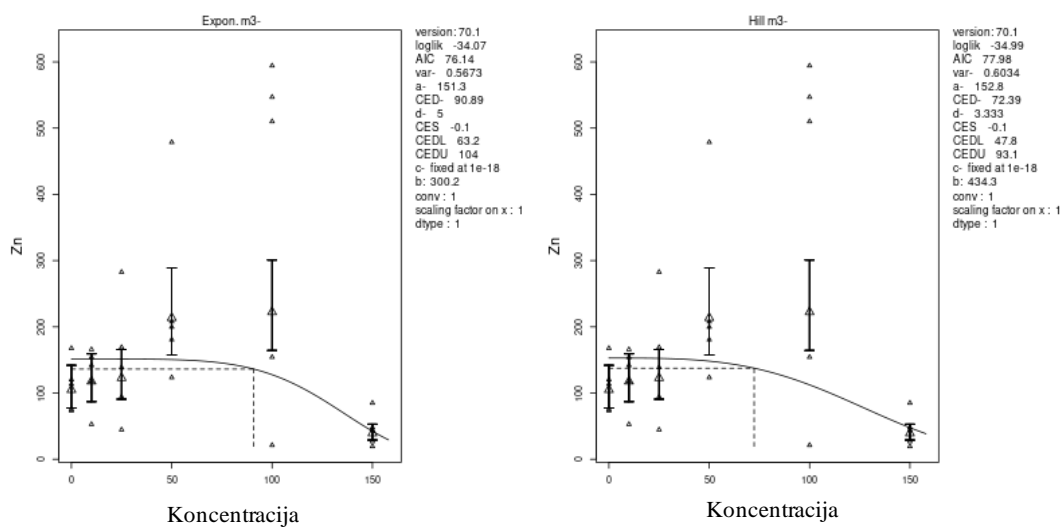
Slika 96. Efekat fluorida na koncentracije Cu u bubrežima pacova.



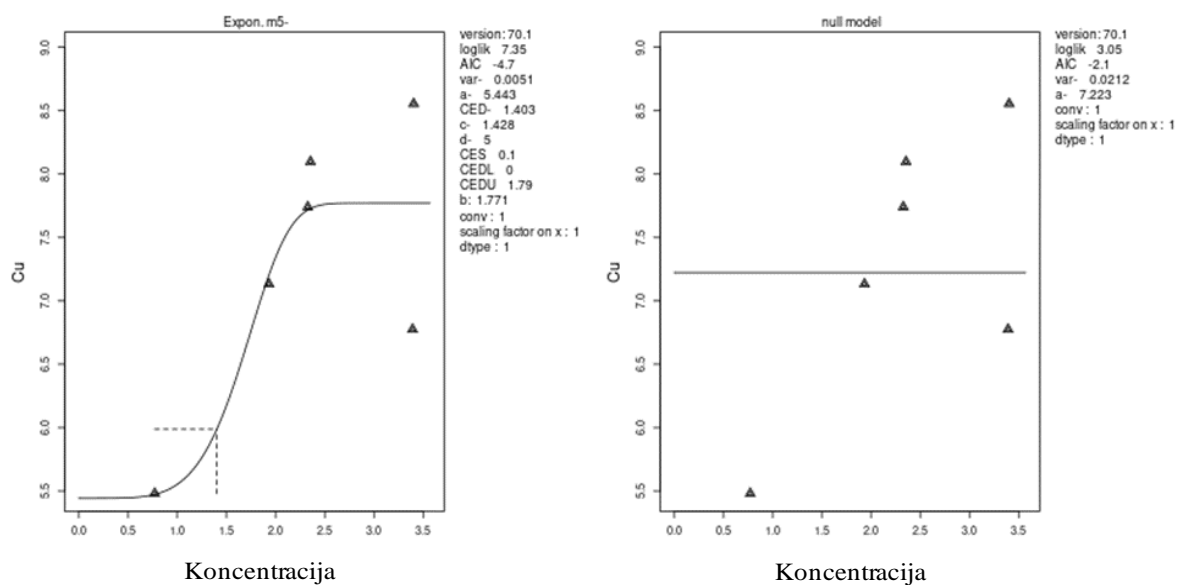
Slika 97. Efekat fluorida na koncentracije Mn u bubrezima pacova.



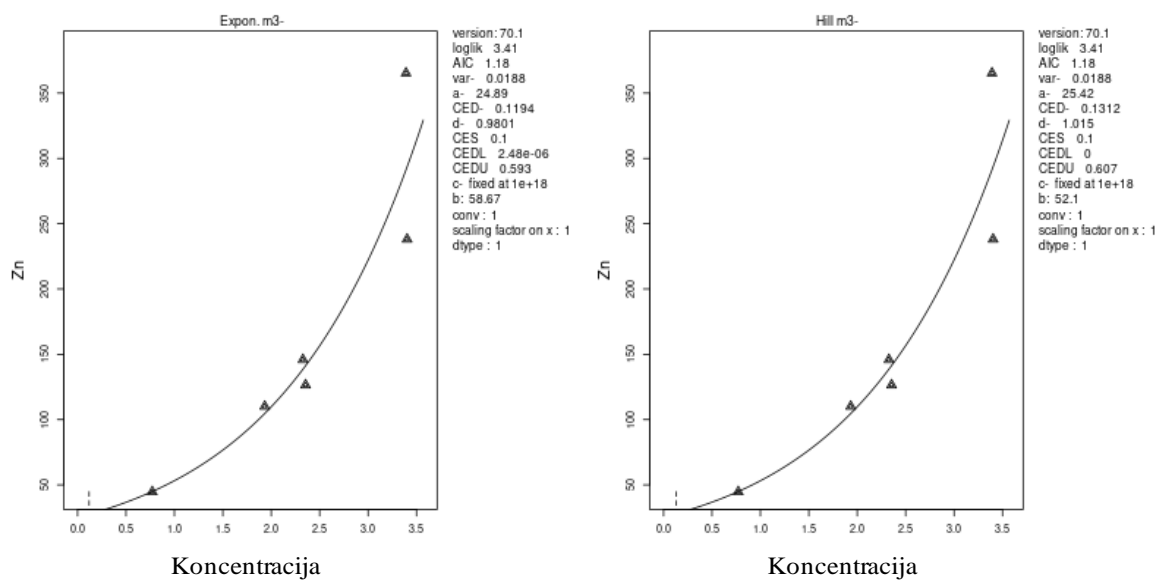
Slika 98. Efekat fluorida na koncentracije Fe u bubrezima pacova.



Slika 99. Efekat fluorida na koncentracije Zn u bubrezima pacova.



Slika 100. Efekat fluorida na koncentracije Cu u bubreziima pacova.



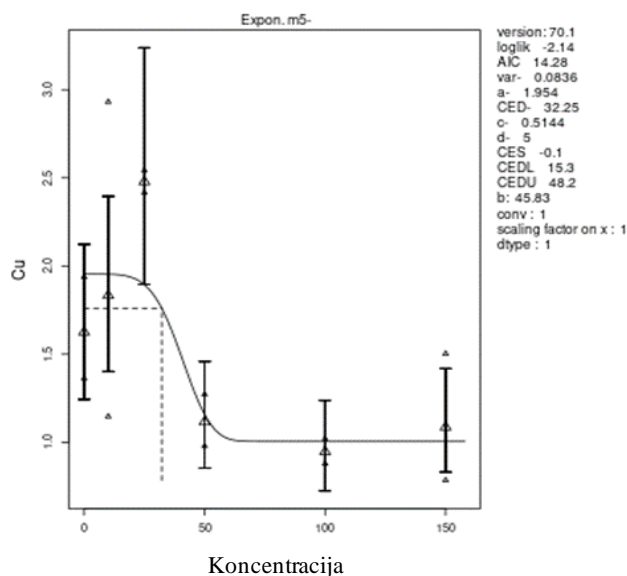
Slika 101. Efekat fluorida na koncentracije Zn u bubreziima pacova.

Potvrđena je dozna zavisnost za efekat F^- na smanjenje koncentracije Cu u slezini (Slika 102) i izračunata je CEDL koncentracija F^- 15,3 mg/kg (Tabela 16).

Tabela 16. Parametri modela za efekat fluorida na bioelemente u slezini pacova.

Bioelement	CED	CEDL	CEDU	D-E trend	Model
	mg/kg F^-				
Cu	32,25	15,3	48,2	da↓	Expon. m5-

D-E doza efekat



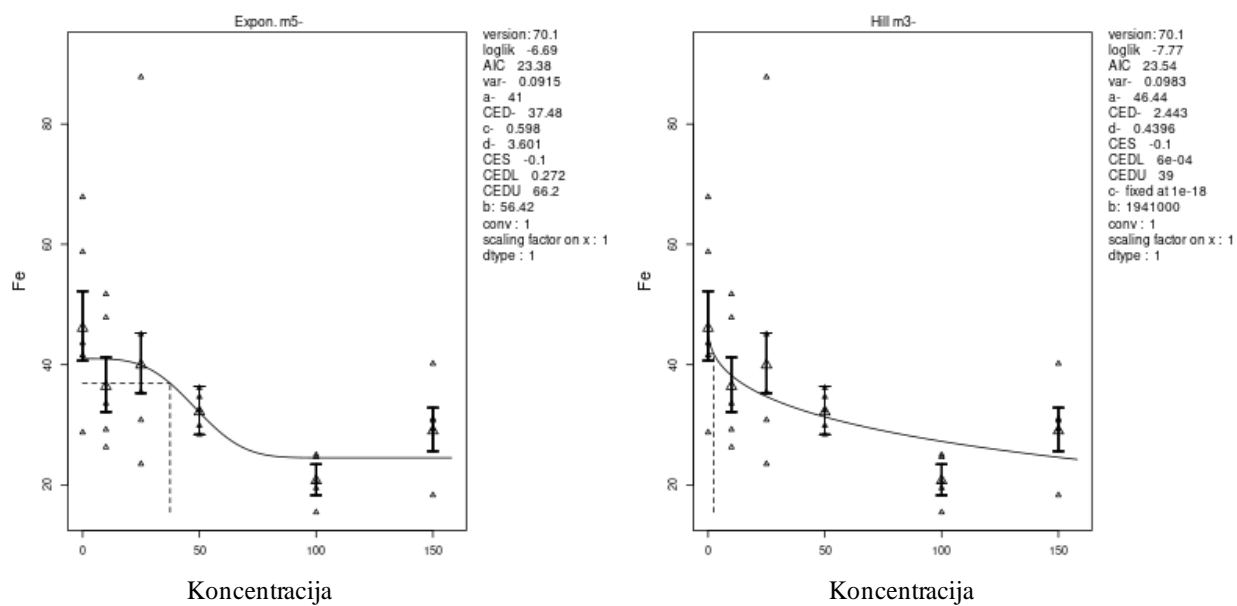
Slika 102. Efekat fluorida na koncentracije Cu u slezini pacova.

Potvrđena je dozna zavisnost za efekat F^- za smanjenje Fe u tkivu mozga (Slike 103 i 104). Izračunata je CEDL koncentracija fluorida $6e-04$ mg/kg odnosno 0,5 mg/kg za efekat smanjenja Fe (Tabela 17).

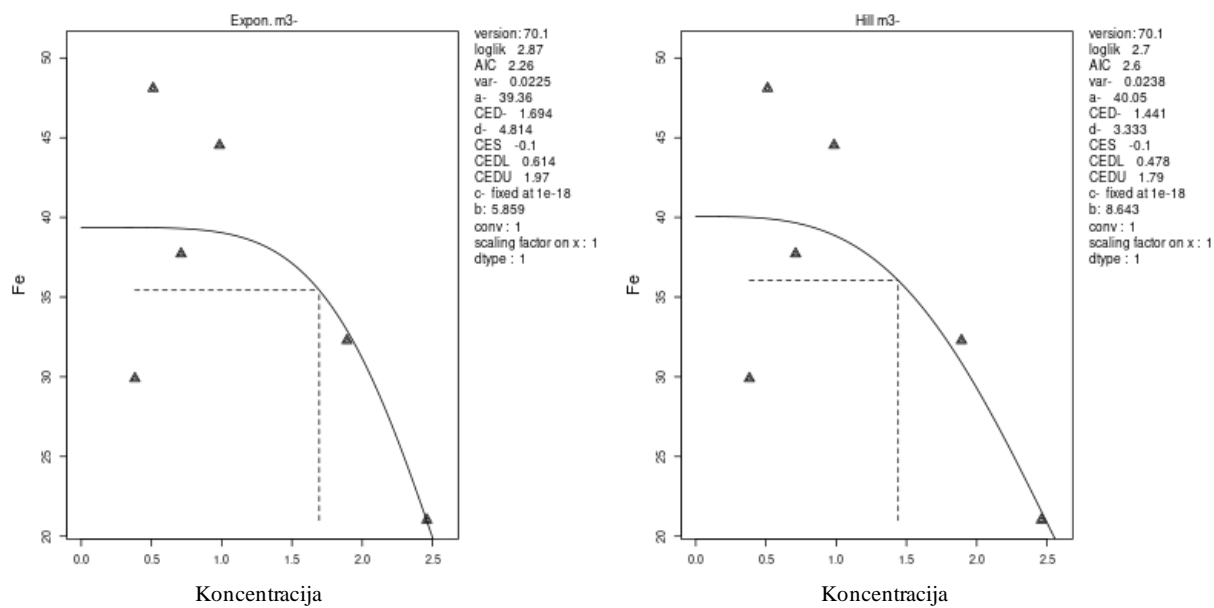
Tabela 17. Parametri modela za efekat fluorida na bioelemente u mozgu pacova.

Bioelement	CED	CEDL	CEDU	D-E trend	Model
	mg/kg F^-				
Eksterne koncentracije					
Fe	37,5	0,3	66,2	da↓	Expon. m5-
	2,4	$6e-04$	39,0		Hill m3-
Interna koncentracija					
Fe	1,7	0,6	1,9	da ↓	Expon. m3-
	1,4	0,5	1,8		Hill m3-

D-E doza efekat



Slika 103. Efekat fluorida na koncentracije Fe ($\mu\text{g/g}$) u mozgu pacova.



Slika 104. Efekat fluorida na koncentracije Fe u mozgu pacova.

4.5.1.3 Koncentracije bioelemenata u kalcifikovanim tkivima

U Tabeli 18 su prikazane koncentracije Cu, Zn i Fe u zubima i femuru *Wistar* pacova nakon subakutne izloženosti rastućim koncentracijama F⁻.

Nisu uočene značajne promene koncentracija Zn u zubima svih doznih grupa. Zatim, zabeležene su značajno povišene koncentracije Fe u uzorcima zuba pacova u grupi koja je pila vodu sa 10 mg/l F⁻ (* p < 0,05). Koncentracije Cu i Mn su bile ispod limita detekcije.

U femuru, značajno snižene koncentracije Cu su zabeležene u grupama F 100 ppm i F 150 ppm (** p < 0,01). Koncentracije Zn su značajno povišene u femuru životinja koje su pile vodu sa 25 i 50 mg/l F⁻ (* p < 0,05). Nisu uočene značajne promene Fe u femuru svih doznih grupa sa F⁻, dok je koncentracija Mn bila ispod limita detekcije.

Tabela 18. Prikaz koncentracija bioelemenata u kalcifikovanim tkivima *Wistar* pacova, nakon subakutne ekspozicije rastućim koncentracijama fluorida.

Uzorak	Bioelementi	Grupe					
		Kontrola	F 10 ppm	F 25 ppm	F 50 ppm	F 100 ppm	F 150 ppm
Zubi	Zn (µg/g)	123,60 108,20-126,90	117,40 116,50-169,00	124,90 115,60-141,00	121,90 116,60-139,50	114,50 113,10-116,50	116,20 65,24-126,50
	Fe (µg/g)	179,30±43,98	312,4±50,75*	244,8±42,48	240,70±44,30	234,10±55,91	222,80±215,3
Femur	Cu (µg/g)	1,66 1,05-1,76	1,31 1,26-1,37	0,91 0,77-1,23	1,24 1,04-3,35	0,62** 0,38-0,84	0,63** 0,23-1,05
	Zn (µg/g)	116,80 102,70-171,70	115,30 108,00-129,20	242,3* 154,3-366,4	192,1* 167,9-227,10	126,20 101,00-152,6	126,70 112,5-286,7
	Fe (µg/g)	67,25 47,96-91,38	51,08 41,62-68,13	82,83 43,65-204,5	39,03 36,71-66,00	47,35 36,90-56,66	57,47 41,57-102,40

Kontrola voda; F 10 ppm natrijum-fluorid 10 mg/l; F 25 ppm natrijum-fluorid 25 mg/l; F 50 ppm natrijum-fluorid 50 mg/l; F 100 ppm natrijum-fluorid 100 mg/l; F 150 ppm natrijum-fluorid 150 mg/l. * p < 0,05; ** p < 0,01 (u poređenju sa kontrolnom grupom). One-way ANOVA/ Fisher LSD test i *Kruskal-Wallis* /Dun *post-hoc* test. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± SD ili kao medijana i interkvartilni opseg.

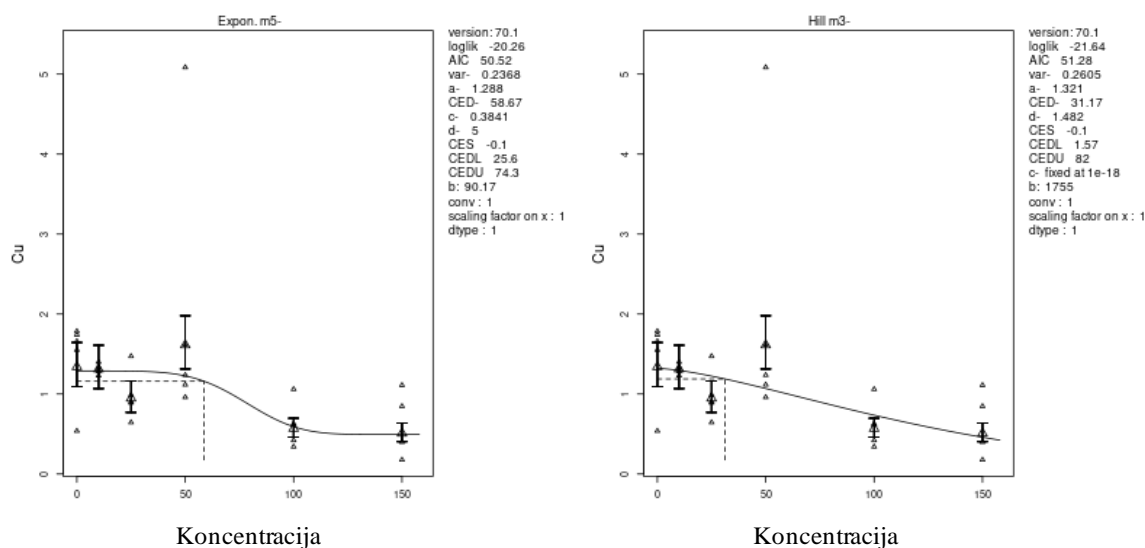
4.5.1.4 Odnos doze i efekta fluorida na bioelemente u kalcifikovanim tkivima

Potvrđena je dozna zavisnost za efekat F^- za smanjenje koncentracija Cu u femuru i smanjenje Zn u zubima (Slike 105-107). Najniže koncentracije F^- (CED) za efekat smanjenja koncentracija Cu u femuru i efekat smanjenja koncentracija Zn u zubima zajedno sa graničnim vrednostima, prikazane su u Tabeli 19. Izračunate su CEDL koncentracije F^- 1,6 mg/kg za efekat smanjenja Cu u femuru i 21,0 mg/kg odnosno 1060,00 mg/kg za efekat smanjenja Zn u zubima.

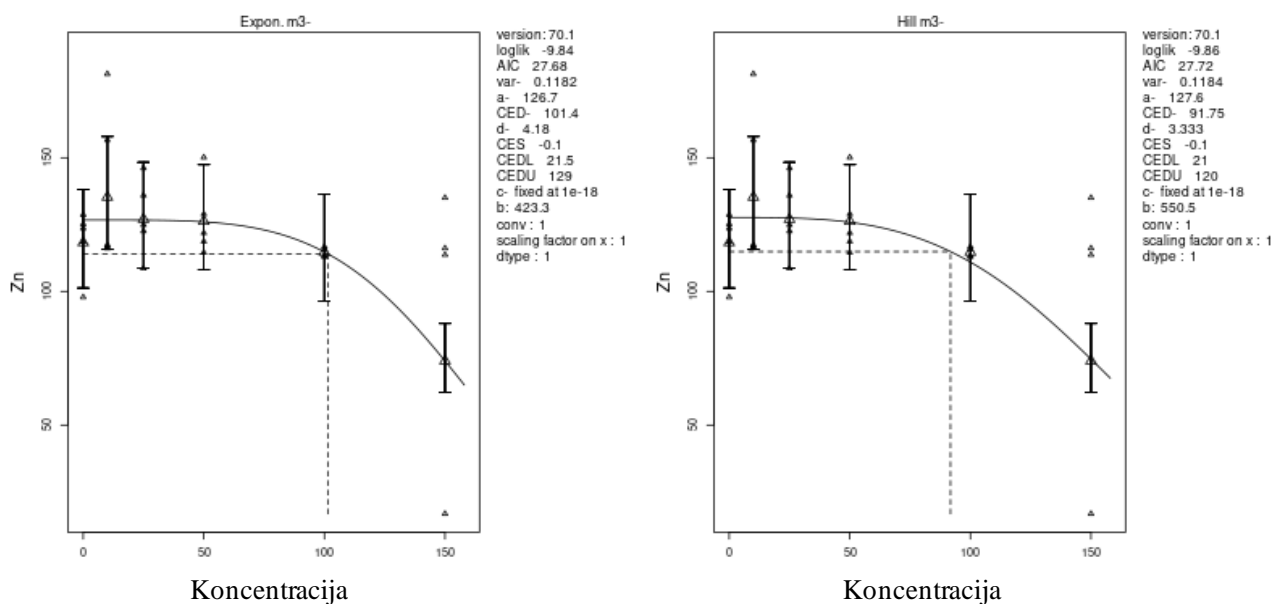
Tabela 19. Parametri modela za efekat fluorida na bioelemente u femuru i zubima.

Tkivo	Bioelement	CED	CEDL		CEDU	D-E trend	Model
			mg/kg F^-				
Eksterna koncentracija							
Femur	Cu	58,8	25,6	74,3	da↓	Expon. m5-	
		31,2	1,6	82,0		Hill m3-	
Zubi	Zn	101,4	21,5	129,0	da↓	Expon. m3-	
		91,7	21,0	120,0		Hill m3-	
Interna koncentracija							
Zubi	Zn	2523,0	1060,0	3800,0	da↓	Expon. M5-	
		2522,0	1070,0	3600,0		Hill m3-	

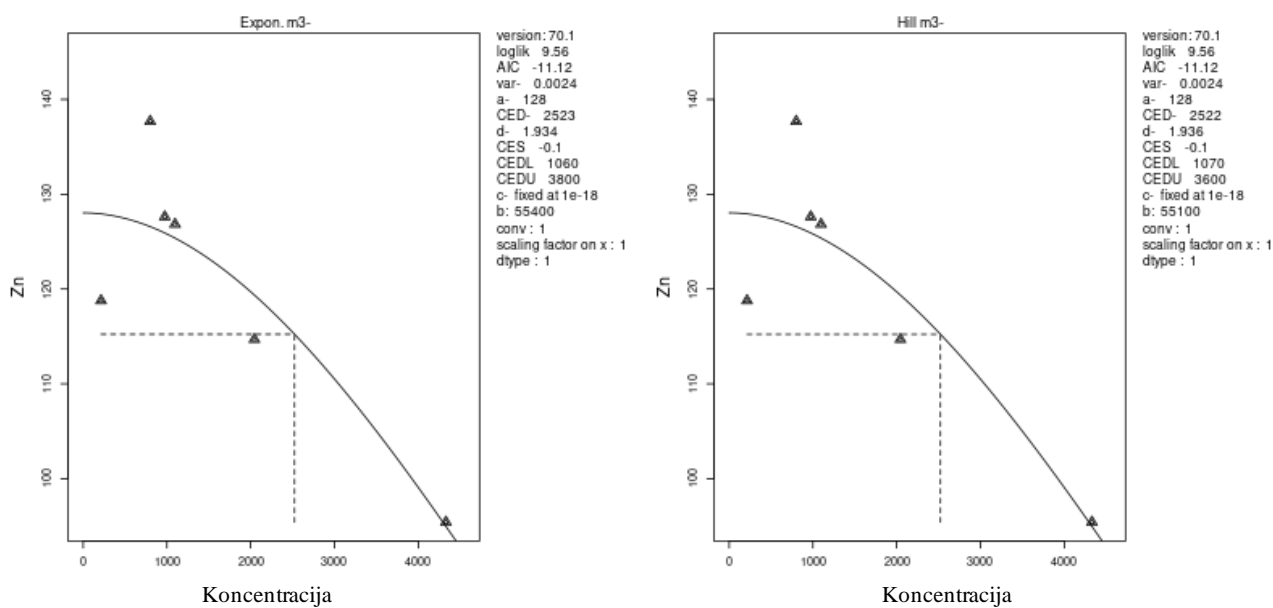
D-E doza efekat



Slika 105. Efekat fluorida na koncentracije Cu u femuru pacova.



Slika 106. Efekat fluorida na koncentracije Zn u zubima pacova.



Slika 107. Efekat fluorida na koncentracije Zn u zubima pacova.

4.5.2 Uticaj suplementacije selenom na bioelemente eksperimentalnih životinja

4.5.2.1 Koncentracije bioelemenata u mekim tkivima

U Tabeli 20 su prikazane koncentracije Cu, Zn, Fe i Mn u krvi, jetri, slezini, bubrezima, mozgu i testisima *Wistar* pacova nakon subakutne izloženosti F⁻ u koncentraciji od 150 mg/l, Se 1,5 mg/l i kombinaciji F⁻ i Se.

U krvi pacova, značajno povišene koncentracije Cu su zabeležene u grupama F 150 ppm i Se (* p < 0,05; **** p < 0,0001). Zatim, koncentracije Zn, Fe i Mn su značajno povišene u grupi pacova koji su pili vodu sa Se (*** p < 0,001; * p < 0,05).

Daljim istraživanjem je ustanovljeno da su u jetri pacova koncentracije Cu značajno snižene u svim grupama (*** p < 0,001; ** p < 0,01; **** p < 0,0001). Nadalje, Zn je značajno povišen u grupi Se (** p < 0,01), dok su koncentracije Fe značajno snižene u grupama F 150 ppm+Se i Se (* p < 0,05; **** p < 0,0001). Mangan je značajno povišen u svim grupama (* p < 0,05; ** p < 0,01).

U slezini pacova nisu uočene značajne promene Cu i Fe. Cink je značajno povišen u grupi pacova koji su pili vodu sa dodatim Se (* p < 0,05) dok je koncentracija Mn bila ispod limita detekcije.

U tkivu bubrega, Cu je značajno snižen u grupi F 150 ppm+Se u odnosu na Se grupu (# p < 0,05). Zatim, koncentracije Zn su značajno snižene u svim grupama (* p < 0,05; ** p < 0,01). Koncentracije Fe su statistički značajno snižene u grupama F 150 ppm i Se (** p < 0,01). Koncentracija Mn je bila ispod limita detekcije.

Analizom tkiva mozga nisu uočene značajne promene Cu. Cink je značajno snižen u grupama F 150 ppm+Se i Se (* p < 0,05; ** p < 0,01). Zatim, uočene su značajno snižene koncentracije Fe kod pacova koji su pili vodu sa 150 ppm F⁻ (* p < 0,05), dok je koncentracija Mn bila ispod limita detekcije.

U testisima pacova, nisu uočene značajne promene Cu, Fe i Mn, dok je Zn značajno povišen kod pacova koji su pili vodu sa Se (* p < 0,05).

Tabela 20. Prikaz koncentracije bioelemenata u tkivima *Wistar* pacova, nakon subakutne suplementacije selenom.

Uzorak	Bioelementi	Grupe			
		Kontrola	F 150 ppm	F 150 ppm+Se	Se
Krv	Cu ($\mu\text{mol/l}$)	22,05 \pm 4,97	32,51\pm8,01*	29,21\pm3,05####	51,03\pm7,88****
	Zn ($\mu\text{mol/l}$)	60,63 47,55-71,44	90,67* 56,84-122,40	84,02# 51,64-106,00	216,40*** 181,40-226,90
	Fe (mmol/l)	4,89 \pm 2,01	5,41 \pm 4,47	4,79\pm2,11###	13,47\pm0,35***
	Mn ($\mu\text{mol/l}$)	35,75 \pm 18,67	56,14 \pm 13,95	52,23 \pm 11,71	62,79\pm24,38*
Jetra	Cu ($\mu\text{g/g}$)	3,78 \pm 0,43	3,07\pm0,18***	3,22\pm0,18*###	2,68\pm0,21****
	Zn ($\mu\text{g/g}$)	29,86 28,79-31,93	31,75 30,97-54,93	32,25# 29,63-37,10	50,28** 45,43-69,18
	Fe ($\mu\text{g/g}$)	122,90 \pm 19,59	121,80 \pm 7,69	105,10\pm11,73####	71,52\pm10,29****
	Mn ($\mu\text{mol/L}$)	3,09 \pm 0,95	4,43\pm1,09*	4,61\pm1,23*	5,08\pm0,62**
Slezina	Cu ($\mu\text{g/g}$)	1,65 \pm 0,41	1,14 \pm 0,51	0,54 \pm 1,27	0,98 \pm 0,00
	Zn ($\mu\text{g/g}$)	34,55 \pm 0,35	36,42 \pm 1,32	42,95 \pm 3,18	46,47\pm7,39*
	Fe ($\mu\text{g/g}$)	239,50 \pm 90,27	250,60 \pm 49,15	287,60 \pm 26,45	224,60 \pm 96,80
Bubrezi	Cu ($\mu\text{g/g}$)	7,58 5,35-8,67	5,05 4,16-7,01	4,49# 3,96-5,54	7,47 5,37-10,70
	Zn ($\mu\text{g/g}$)	113,4 74,50-143,90	43,87* 23,21-66,48	29,59** 22,90-39,13	31,32** 23,86-50,85
	Fe ($\mu\text{g/g}$)	81,78 71,67-101,60	36,48** 31,99-39,67	44,40 40,02-51,71	37,58** 28,45-47,89
Mozak	Cu ($\mu\text{g/g}$)	2,79 \pm 1,39	2,21 \pm 0,76	2,88 \pm 0,31	3,18 \pm 0,68
	Zn ($\mu\text{g/g}$)	20,08 13,12-38,46	12,18 8,30-17,03	7,29* 4,62-10,10	1,99** 0,52-17,20
	Fe ($\mu\text{g/g}$)	48,10 \pm 15,35	29,9\pm7,78*	35,34 \pm 9,85	44,00 \pm 11,27
Testisi	Cu ($\mu\text{g/g}$)	1,67 \pm 0,50	1,63 \pm 0,23	1,57 \pm 0,53	1,97 \pm 0,15
	Zn ($\mu\text{g/g}$)	22,97 19,14-30,13	26,10 25,08-28,98	27,34 25,73-28,31	30,71 27,32-32,09*
	Fe ($\mu\text{g/g}$)	16,55 13,95-19,27	19,02 15,19-48,32	18,02 17,42-19,41	18,63 15,32-19,47
	Mn ($\mu\text{mol/L}$)	0,76 0,23-1,32	0,53 0,27-0,56	0,16 0,13-0,45	0,28 0,27-0,44

Kontrola voda; F 150 ppm natrijum-fluorid 150 mg/l; F 150 ppm+Se natrijum-fluorid 150 mg/l+1,5 mg/l natrijum-selenit; Se natrijum-selenit. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (u poređenju sa kontrolnom grupom). # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$ (u poređenju sa Se grupom). *One-way ANOVA/ Fisher LSD test i Kruskal-Wallis /Dun post-hoc test.* Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD ili kao medijana i interkvartilni opseg.

4.5.2.2 Koncentracije bioelemenata u kalcifikovanim tkivima

U Tabeli 21 prikazane su koncentracije bioelemenata u kalcifikovanim tkivima *Wistar* pacova, nakon suplementacije Se.

U uzorcima zuba pacova, značajno povišene koncentracije Zn su zabeležene u grupi pacova koji su pili vodu sa dodatim Se (* $p < 0,05$). Zatim, u zubima nisu uočene značajne promene koncentracija Fe svih grupa, dok su koncentracije Cu i Mn bile ispod limita detekcije. U uzorcima femura, značajan pad koncentracije Cu je zabeležen u grupi F 150 ppm+Se (** $p < 0,01$). Nisu uočene značajne promene koncentracija Zn i Fe u femuru, dok je koncentracija Mn bila ispod limita detekcije.

Tabela 21. Prikaz koncentracije bioelemenata u kalcifikovanim tkivima *Wistar* pacova, nakon suplementacije selenom.

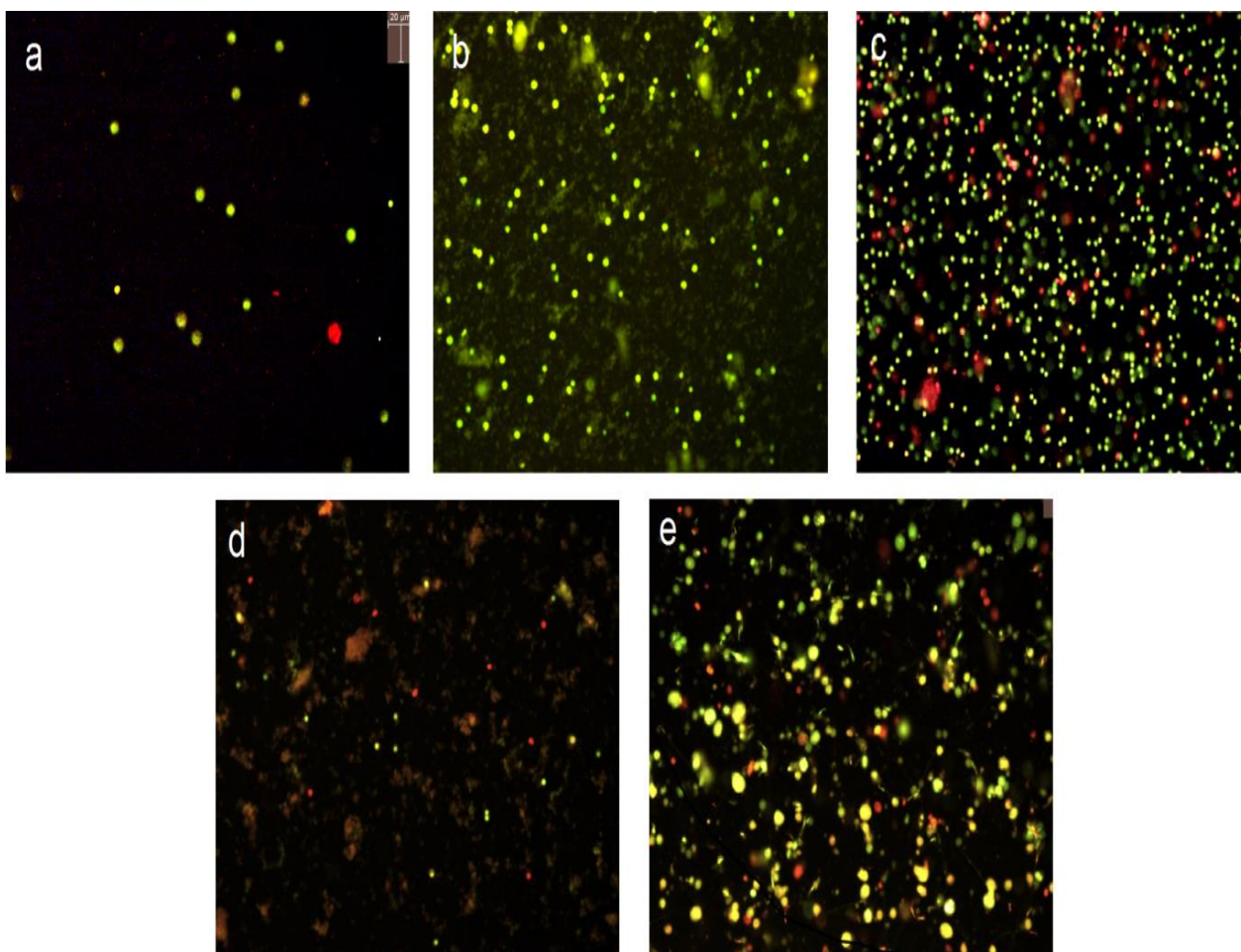
Uzorak	Bioelementi	Grupe			
		Kontrola	F 150 ppm	F 150 ppm+Se	Se
Zubi	Zn ($\mu\text{g/g}$)	123,60 108,20-126,90	114,90 41,02-130,30	114,90^{##} 111,80-117,90	157,20* 142,30-170,40
	Fe ($\mu\text{g/g}$)	168,80 142,10-221,60	160,00 64,71-443,70	225,60 204,60-300,20	178,20 135,70-190,30
Femur	Cu ($\mu\text{g/g}$)	1,66 1,04-1,76	0,62 0,23-1,04	0,19*** 0,09-0,50	1,62 1,34-1,82
	Zn ($\mu\text{g/g}$)	116,80 102,70-171,70	126,70 112,50-286,70	113,00 106,80-125,10	117,70 106,30-156,10
	Fe ($\mu\text{g/g}$)	67,25 47,96-91,38	57,47 41,57-102,40	34,19 32,17-42,10	41,40 36,30-55,70

Kontrola voda; F 150 ppm natrijum-fluorid 150 mg/l; F 150 ppm+Se natrijum-fluorid 150 mg/l+1,5 mg/l natrijum-selenit; Se natrijum-selenit. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (u poređenju sa kontrolnom grupom). *Kruskal-Wallis* /Dun *post-hoc* test. Vrednosti su prikazane kao medijana i interkvartilni opseg.

4.6 Genotoksični efekat fluorida

4.6.1 Uticaj fluorida i/ili selen na ćelijsku vijabilnost i učestalost izuzetno oštećenih jedara

Protokol koji je korišćen za pripremu ćelijske suspenzije nije uticao na ćelijsku vijabilnost (Slika 108). Za krv, jetru, slezinu i testise ćelijska vijabilnost je bila oko 80%. Izuzetak su ćelije mozga, kod kojih je zabeležena ćelijska vijabilnost oko 70%. Učestalost IOJ je analizirana za svaki gel pojedinačno (Tabela 22). Izuzev u tkivu mozga, odstupanja u ostalim tkivima su sporadična.



Slika 108. Diferencijalno bojenje ćelijskih suspenzija (a) krvi, (b) jetre, (c) slezine, (d) mozga i (e) testisa, 100x. Ćelije sa zelenim jedrom se smatraju živim, dok se ćelije sa crvenim jedrom smatraju mrtvim.

Tabela 22. Frekvencija izuzetno oštećenih jedara (*hedgehogs*) u % (srednja vrednost \pm SD).

Grupa	Testisi	Jetra	Krv	Mozak	Slezina
Kontrola	0,2 \pm 0,6	3,6 \pm 2,6	0	0,0	5,7 \pm 5,4
F 10 ppm	2,3 \pm 2,0*	6,7 \pm 5,2	0	3,7 \pm 3,5*	2,3 \pm 2,3
F 25 ppm	0,8 \pm 1,0	3,6 \pm 2,3	0	2,7 \pm 1,6*	2,7 \pm 2,2
F 50 ppm	3,2 \pm 2,8*	7,6 \pm 5,3	0,2 \pm 0,6	4,4 \pm 4,6*	9,3 \pm 5,3
F 100 ppm	2,2 \pm 3,0	3,8 \pm 2,9	0	2,7 \pm 2,2*	5,0 \pm 4,7
F 150 ppm	1,2 \pm 1,6	3,0 \pm 3,4	0,4 \pm 0,8*	3,9 \pm 3,4*	5,9 \pm 5,4
F 150 ppm+Se	4,9 \pm 4,6 ^{a*}	4,4 \pm 4,3	0	4,2 \pm 3,4*	9,4 \pm 4,1
Se	1,2 \pm 1,8	0,4 \pm 1,2	0	3,6 \pm 4,9*	1,7 \pm 2,4

Kontrola voda; F 10 ppm natrijum-fluorid 10 mg/l; F 25 ppm natrijum-fluorid 25 mg/l; F 50 ppm natrijum-fluorid 50 mg/l; F 100 ppm natrijum-fluorid 100 mg/l; F 150 ppm natrijum-fluorid 150 mg/l; F 150 ppm+Se natrijum-fluorid 150 ppm+ natrijum-selenit 1,5mg/l; Se natrijum-selenit 1,5mg/l. * vrednosti se statistički razlikuju od kontrolne grupe; ^a vrednosti se statistički razlikuju od F 150 grupe ($p < 0,05$). Studentov t test/*Mann Whitney*.

4.6.2 DNK oštećenje jedara testisa, jetre, krvi, mozga i slezine

Tabele 23 i 24 prikazuju vrednosti intenziteta repa kometa za svaku eksperimentalnu životinju. Izuzev nekoliko životinja, nisu uočena značajna odstupanja u okviru grupa.

Tabela 23. Nivo oštećenja DNK molekula u jedinkama mužjaka *Wistar* pacova koji su pili vodu sa fluoridima. Prikazane su vrednosti intenziteta repa kometa (srednja vrednost \pm SD). Boldirane vrednosti su autlajeri i izostavljeni su iz daljih analiza. Studentov t test/Mann Whitney.

Grupa	Broj pacova	Testisi	Jetra	Krv	Mozak	Slezina
Kontrola	1	2,3 \pm 5,0	1,4 \pm 2,7	0,8\pm1,7	2,2 \pm 4,4	0,7 \pm 1,7
	2	1,2\pm2,0	1,7 \pm 3,3	1,6 \pm 8,9	1,4 \pm 3,2	0,6 \pm 1,4
	3	2,0 \pm 4,0	1,9 \pm 2,6	0,7 \pm 1,3	2,9 \pm 3,6	0,4 \pm 0,8
	4	2,1 \pm 5,0	1,5 \pm 2,0	1,0 \pm 1,8	1,9 \pm 6,3	0,9 \pm 1,4
	5	1,9 \pm 4,9	5,8\pm11,7	1,1 \pm 3,4	1,2 \pm 2,4	1,7 \pm 3,4
F 10 ppm	1	4,0 \pm 5,7	31,0 \pm 34,7	2,8 \pm 7,7	14,6 \pm 13,9	2,8 \pm 9,8
	2	4,8 \pm 8,1	22,2 \pm 28,7	1,0 \pm 2,0	11,0 \pm 17,6	3,6 \pm 11,3
	3	4,8 \pm 8,3	3,5\pm4,9	0,9 \pm 1,9	13,3 \pm 15,2	2,3 \pm 9,3
	4	9,3 \pm 15,4	15,0 \pm 20,3	1,4 \pm 2,7	9,3 \pm 14,4	4,3 \pm 13,6
	5	8,7 \pm 14,3	34,0 \pm 31,1	0,8 \pm 1,6	17,2 \pm 22,5	6,9 \pm 18,8
F 25 ppm	1	4,4 \pm 7,5	14,0 \pm 14,0	0,9 \pm 2,4	13,7 \pm 15,7	5,1 \pm 16,0
	2	1,6 \pm 5,7	14,1 \pm 14,1	1,1 \pm 2,3	12,0 \pm 16,6	4,9 \pm 15,9
	3	5,1 \pm 8,5	11,8 \pm 11,8	0,6 \pm 0,9	9,2 \pm 16,1	4,3 \pm 9,9
	4	5,6 \pm 8,7	13,8 \pm 13,8	0,9 \pm 1,6	10,5 \pm 16,3	4,1 \pm 11,9
	5	3,8 \pm 8,2	19,0 \pm 19,0	0,7 \pm 1,1	9,7 \pm 15,9	6,1 \pm 14,9
F 50 ppm	1	6,3 \pm 10,7	3,2 \pm 6,7	1,3 \pm 3,4	19,2 \pm 19,0	1,0\pm2,8
	2	14,9 \pm 16,0	6,0 \pm 12,1	1,3 \pm 3,1	9,0 \pm 12,2	6,4 \pm 17,4
	3	8,3 \pm 11,8	7,7 \pm 13,1	1,1 \pm 3,4	16,7 \pm 14,3	2,0 \pm 9,9
	4	10,1 \pm 14,6	4,4 \pm 7,9	2,1 \pm 6,1	9,9 \pm 17,8	5,7 \pm 14,6
	5	11,0 \pm 18,3	9,2 \pm 10,1	2,5 \pm 6,2	6,6 \pm 12,8	4,2 \pm 12,4
F 100 ppm	1	8,2 \pm 10,3	7,7 \pm 15,6	0,4 \pm 0,9	7,1 \pm 7,1	1,4\pm3,2
	2	8,9 \pm 12,8	3,7 \pm 12,6	0,6 \pm 1,4	6,3 \pm 11,9	5,2 \pm 15,0
	3	5,7 \pm 12,8	4,9 \pm 14,0	1,1 \pm 3,1	12,2 \pm 15,2	3,7 \pm 9,6
	4	3,4 \pm 4,2	4,8 \pm 11,9	0,7 \pm 1,7	7,6 \pm 16,7	3,8 \pm 13,8
	5	4,2 \pm 10,2	6,8 \pm 11,8	0,7 \pm 1,6	12,6 \pm 15,7	2,8 \pm 8,2
F 150 ppm	1	10,5 \pm 17,5	12,7 \pm 20,8	1,1 \pm 2,6	17,6 \pm 22,2	12,5 \pm 22,7
	2	6,5 \pm 12,2	12,0 \pm 21,1	1,0 \pm 2,4	12,1 \pm 21,1	9,5 \pm 22,7
	3	6,2 \pm 9,9	8,3 \pm 18,3	1,8 \pm 6,1	11,0 \pm 17,1	8,6 \pm 20,1
	4	13,5 \pm 18,8	5,3 \pm 10,9	0,5 \pm 1,3	20,7 \pm 21,9	10,0 \pm 20,0
	5	8,8 \pm 13,6	12,6 \pm 21,7	1,8 \pm 4,1	10,5 \pm 16,2	10,9 \pm 20,7

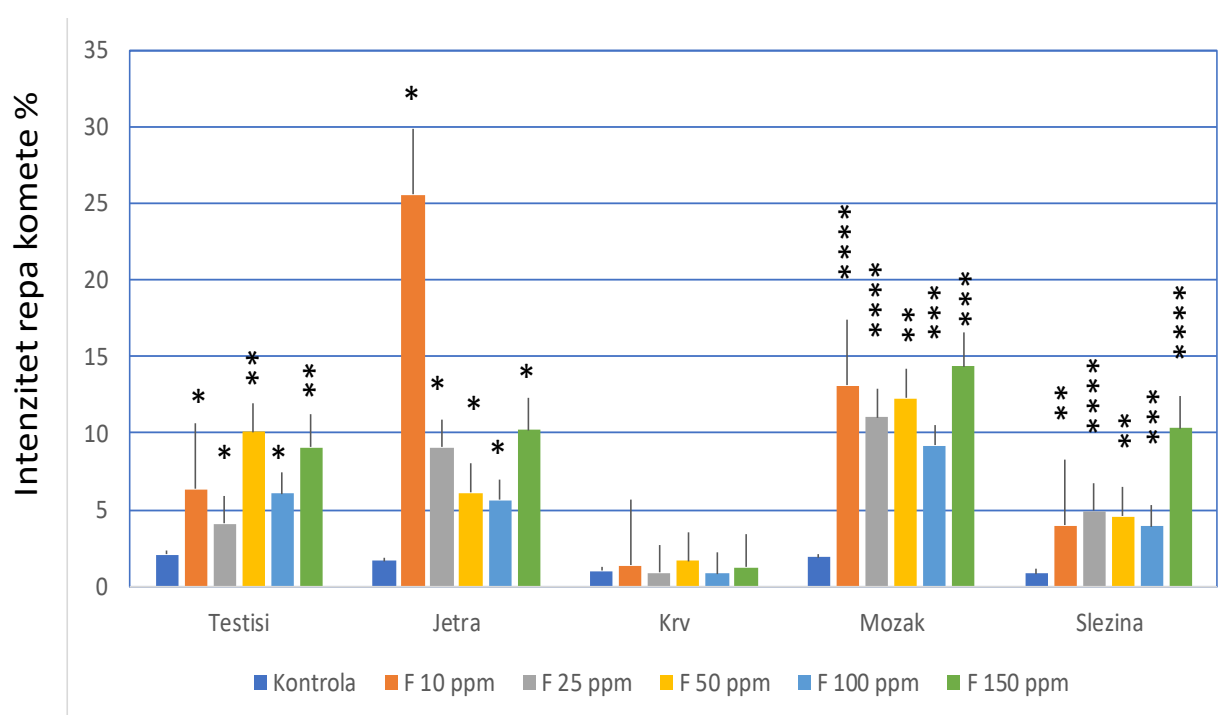
Kontrola voda; F 10 ppm natrijum-fluorid 10 mg/l; F 25 ppm natrijum-fluorid 25 mg/l; F 50 ppm natrijum-fluorid 50 mg/l; F 100 ppm natrijum-fluorid 100 mg/l; F 150 ppm natrijum-fluorid 150 mg/l. $p < 0.05$.

Tabela 24. Nivo oštećenja DNK molekula u jedinkama mužjaka *Wistar* pacova koju su pili vodu sa fluoridima i/ili selenom. Prikazane su vrednosti intenziteta repa kometa (srednja vrednost \pm SD). Boldirane vrednosti su autlajeri i izostavljeni su iz daljih analiza. Studentov t test/*Mann Whitney*.

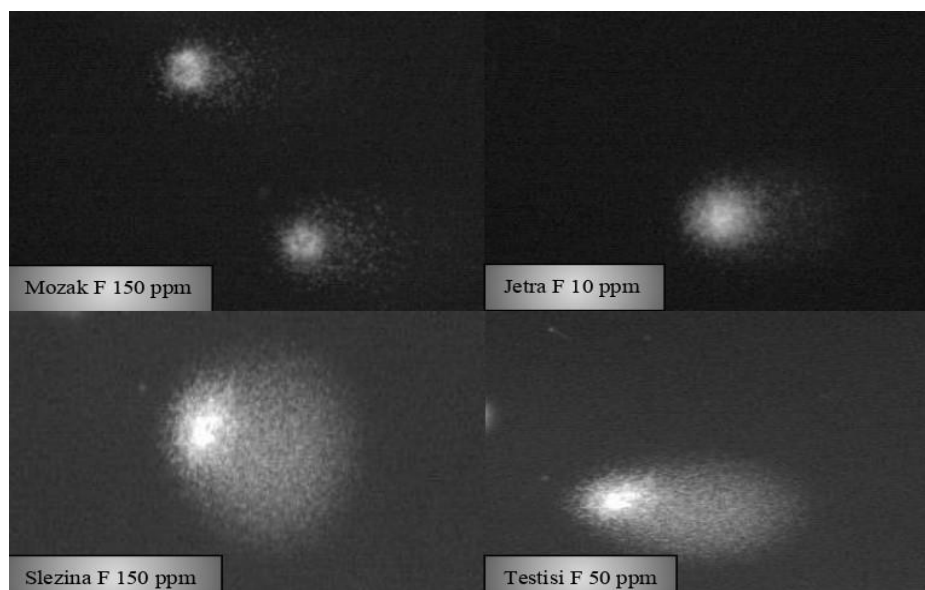
Grupa	Broj pacova	Testisi	Jetra	Krv	Mozak	Slezina
Kontrola	1	2,3 \pm 5,0	1,4 \pm 2,7	0,8\pm1,7	2,2 \pm 4,4	0,7 \pm 1,7
	2	1,2\pm2,0	1,7 \pm 3,3	1,6 \pm 8,9	1,4 \pm 3,2	0,6 \pm 1,4
	3	2,0 \pm 4,0	1,9 \pm 2,6	0,7 \pm 1,3	2,9 \pm 3,6	0,4 \pm 0,8
	4	2,1 \pm 5,0	1,5 \pm 2,0	1,0 \pm 1,8	1,9 \pm 6,3	0,9 \pm 1,4
	5	1,9 \pm 4,9	5,8\pm11,7	1,1 \pm 3,4	1,2 \pm 2,4	1,7 \pm 3,4
F 150 ppm	1	10,5 \pm 17,5	12,7 \pm 20,8	1,1 \pm 2,6	17,6 \pm 22,2	12,5 \pm 22,7
	2	6,5 \pm 12,2	12,0 \pm 21,1	1,0 \pm 2,4	12,1 \pm 21,1	9,5 \pm 22,7
	3	6,2 \pm 9,9	8,3 \pm 18,3	1,8 \pm 6,1	11,0 \pm 17,1	8,6 \pm 20,1
	4	13,5 \pm 18,8	5,3 \pm 10,9	0,5 \pm 1,3	20,7 \pm 21,9	10,0 \pm 20,0
	5	8,8 \pm 13,6	12,6 \pm 21,7	1,8 \pm 4,1	10,5 \pm 16,2	10,9 \pm 20,7
F 150+Se	1	5,7 \pm 7,4	4,4 \pm 8,9	0,6 \pm 1,4	9,5 \pm 8,9	2,9 \pm 11,3
	2	4,1 \pm 5,1	15,6\pm15,7	0,7 \pm 1,7	27,9\pm18,3	4,2 \pm 12,4
	3	5,1 \pm 7,1	3,1 \pm 11,8	2,2 \pm 4,8	15,3 \pm 13,5	2,9 \pm 11,5
	4	9,9 \pm 14,7	5,7 \pm 11,5	1,5 \pm 2,0	11,0 \pm 15,6	2,0 \pm 5,2
	5	8,6 \pm 13,2	5,9 \pm 11,8	1,1 \pm 2,7	17,0 \pm 20,1	3,6 \pm 11,9
Se	1	4,5 \pm 6,8	2,3 \pm 4,3	1,7 \pm 3,1	4,2 \pm 5,7	2,1 \pm 4,3
	2	4,5 \pm 6,0	4,3 \pm 5,2	0,9 \pm 1,7	4,7 \pm 8,1	18 \pm 2,9
	3	4,0 \pm 5,6	7,6 \pm 8,3	1,2 \pm 2,0	4,0 \pm 5,7	1,3 \pm 2,0
	4	5,0 \pm 7,8	4,2 \pm 5,8	1,2 \pm 2,2	4,7 \pm 6,9	2,0 \pm 3,2
	5	4,1 \pm 7,1	6,1 \pm 7,1	1,2 \pm 2,4	2,6\pm4,0	1,3 \pm 3,5

Kontrola voda; F 150 ppm natrijum-fluorid 150 mg/l; F 150 ppm+Se natrijum-fluorid 150 ppm+ natrijum-selenit 1,5mg/l; Se natrijum-selenit 1,5mg/l. $p < 0,05$.

Na slici 109 prikazan je efekat rastućih koncentracija F^- na ćelije testisa, jetre, krvi, mozga i slezine *Wistar* pacova između grupa. Analizom ćelija krvi, nisu uočene značajne varijacije u nivou DNK oštećenja u poređenju sa kontrolnom grupom. Analizom testisa, jetre, mozga i slezine eksperimentalnih pacova, uočen je značajan porast DNK oštećenja u svim doznim grupama. U ćelijama testisa, najveće DNK oštećenje je uočeno u grupama koje su pile vodu sa 50 i 150 mg/l F^- ($p < 0,01$). U tkivu jetre, najveće oštećenje je zabeleženo u grupi pacova koji su pili vodu sa 10 mg/l F^- ($p < 0,05$). U ćelijama mozga i slezine, najveće oštećenje je uočeno u grupama koje su pile vodu sa 150 mg/l F^- ($p < 0,0001$). Na Slici 110 su prikazane komete različitih ćelija pacova nakon ekspozicije F^- .

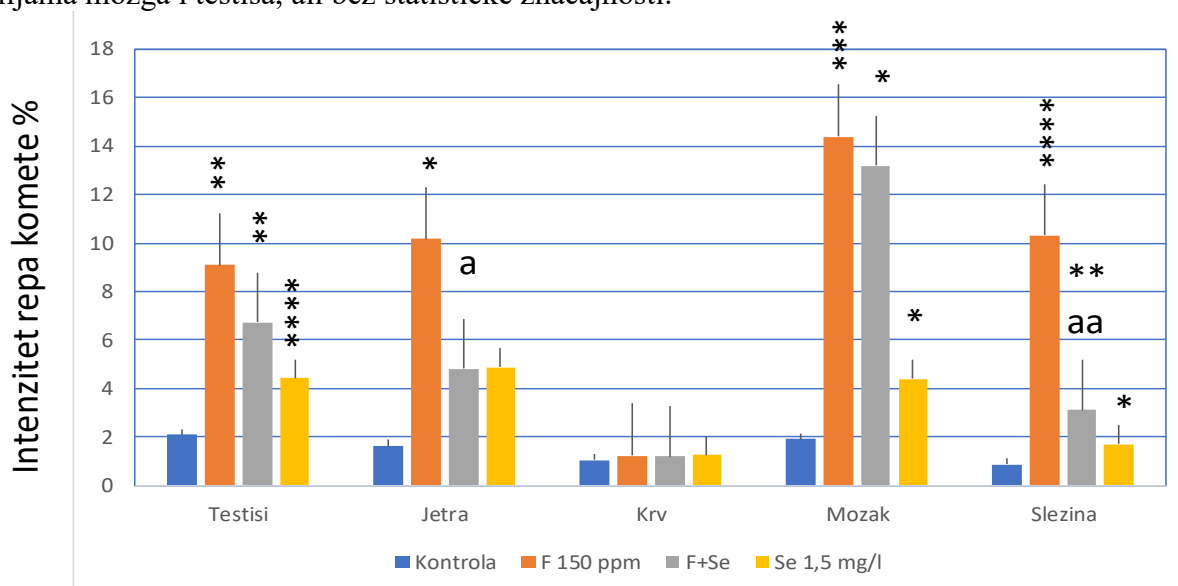


Slika 109. Nivo DNK oštećenja u ćelijama *Wistar* pacova nakon izloženosti fluoridima. Kontrola voda; F 10 ppm natrijum-fluorid 10 mg/l; F 25 ppm natrijum-fluorid 25 mg/l; F 50 ppm natrijum-fluorid 50 mg/l; F 100 ppm natrijum-fluorid 100 mg/l; F 150 ppm natrijum-fluorid 150 mg/l. Studentov t test/Mann Whitney. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (u poređenju sa kontrolnom grupom). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Autlajeri su isključeni iz analiza.



Slika 110. Prikaz kometa različitih ćelija *Wistar* pacova nakon subakutne ekspozicije rastućim koncentracijama fluorida.

Na Slici 111 prikazan je efekat suplementacije Se na smanjenje DNK oštećenja izazvanih F⁻ kod *Wistar* pacova. Analizom krvi, nisu uočene značajne varijacije u nivou DNK oštećenja u poređenju sa kontrolnim grupama. Analizom testisa, mozga i slezine eksperimentalnih pacova, uočen je značajan porast DNK oštećenja u svim grupama. U jetri je uočeno značajno oštećenje samo u grupi koja je pila vodu sa 150 mg/l F⁻ (* p < 0,05). Suplementacija Se je značajno smanjila DNK oštećenje u jetri i slezini u poređenju sa F 150 ppm grupom. Redukcija DNK oštećenja je takođe uočena u ćelijama mozga i testisa, ali bez statističke značajnosti.



Slika 111. Nivo DNK oštećenja u ćelijama *Wistar* pacova nakon izloženosti fluoridima i/ili selenu. Kontrola voda; F 150 ppm natrijum-fluorid 150 mg/l; F+Se natrijum-fluorid 150 mg/l+ natrijum-selenit 1,5mg/l; Se natrijum-selenit 1,5 mg/l. Studentov t test/Mann Whitney. ^a* p < 0,05; ^{aa}** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001. * u poređenju sa kontrolnom grupom; ^a u poređenju sa F 150 ppm grupom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost±SD. Autlajeri su isključeni iz analiza.

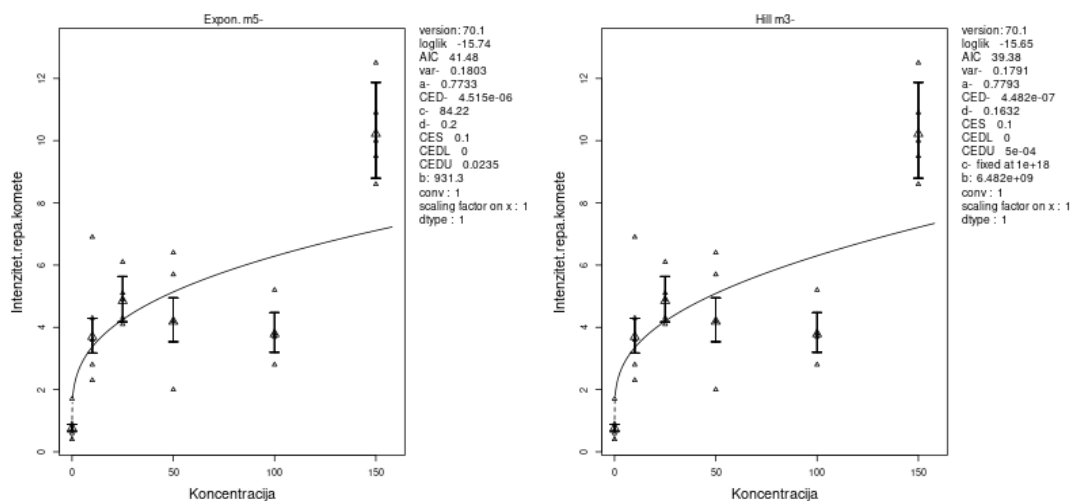
4.6.3 Odnos doze i efekta fluorida na oštećenje DNK

Urađene su analize za efekat F^- na intenzitet repa kometa i dozna zavisnost je potvrđena u slezini i testisima za efekat F^- na povećanje intenziteta repa kometa (Slike 112-114). Izračunate su CEDL koncentracije fluorida 0,0 mg/kg za efekat povećanja intenziteta repa kometa u slezini i $1e-04$ mg/kg odnosno 0,00 mg/kg u testisima (Tabela 25).

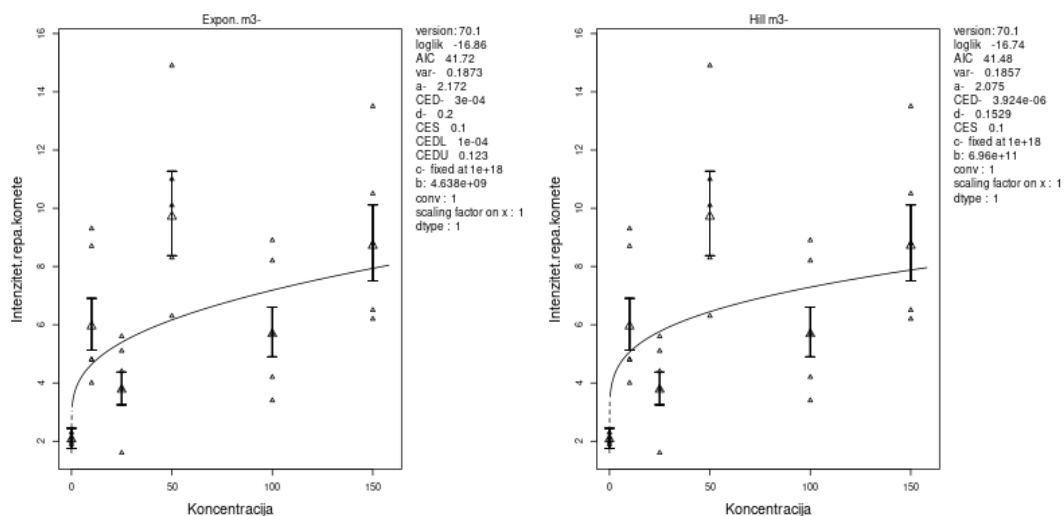
Tabela 25. Parametri modela za efekat fluorida na oštećenje DNK kod pacova.

Tkivo	CEDL mg/kg F^-			D-E trend	Model
	CED	CEDL	CEDU		
Eksterne koncentracije					
Slezina	4,5e-06	0,0	0,02	da↑	Expon. m5-
	4,5e-07	0,0	5e-04		Hill m3-
Testisi	3e-04	1e-04	0,12	da↑	Expon. m3-
Interne koncentracije					
Testisi	0,06	0,05	0,19	da↑	Expon. m5-
	0,09	0,08	0,14		Hill m3-

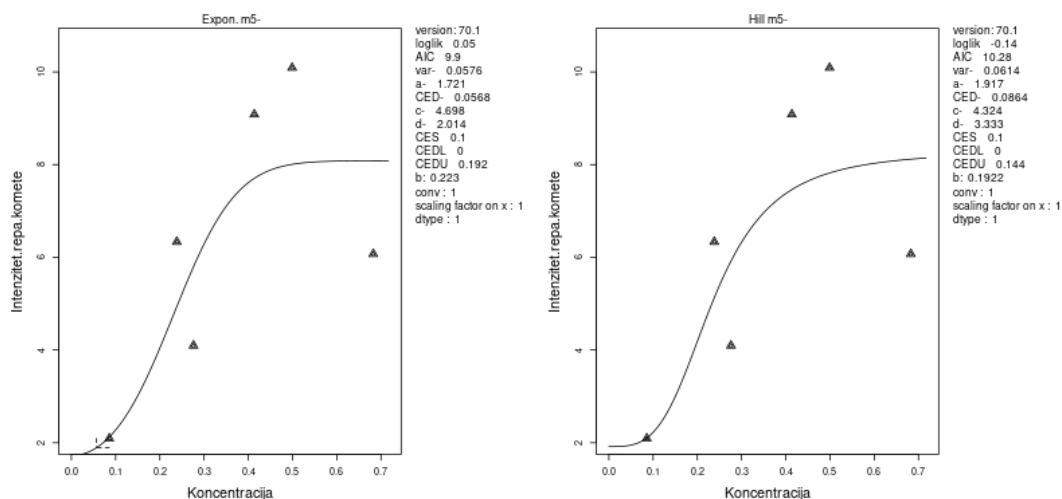
D-E doza efekat



Slika 112. Efekat fluorida na intenzitet repa kometa u slezini pacova.



Slika 113. Efekat fluorida na intenzitet repa kometa u testisima pacova.



Slika 114. Efekat fluorida na intenzitet repa kometa u testisima pacova.

4.7 Korelacione analize

Na osnovu telesne mase pacova, prosečne zapremine popijene vode i eksternih koncentracija F^- koje su pacovi dobijali putem vode za piće, izračunate su prosečne eksterne doze F^- (mg/kg/dan) po eksperimentalnoj životinji (Tabela 26).

Tabela 26. Prikaz eksternih koncentracija i eksternih doza fluorida.

Eksterna koncentracija (mg/l)	Eksterna doza (mg/kg/dan)
0	0
10	1,4
25	3,5
50	6,2
100	13,6
150	19,2

4.7.1 Korelacione analize između eksternih koncentracija i internih doza fluorida

Interne doze F^- predstavljaju izmerene koncentracije F^- u tkivima. Korelacionom analizom utvrđeno je da postoji statistički značajna pozitivna korelacija između eksternih koncentracija i internih doza F^- u zubima *Wistar* pacova (Tabela 27).

Tabela 27. Koeficijenti korelacije između eksternih koncentracija i internih doza fluorida.

Tkivo	Korelacija:eksterna koncentracija interna doza fluorida
Jetra	R=0,7173 p=0,109
Slezina	R=-0,7030 p=0,119
Bubrezi	R=-0,1649 p=0,755
Mozak	R=0,1729 p=0,743
Testisi	R=0,6809 p=0,136
Zubi	R=0,9608 p=0,002

R-koeficijent korelacije. p <0,05

4.7.2 Korelacione analize između odnosa eksternih i internih doza fluorida

Korelacionom analizom utvrđeno je da postoji statistički značajna pozitivna korelacija između eksternih i internih doza F⁻ u zubima *Wistar* pacova (Tabela 28).

Tabela 28. Koeficijenti korelacije između eksternih i internih doza fluorida.

Tkivo	Korelacija:eksterna doza i interna doza fluorida
Jetra	R=0,7201 p=0,107
Slezina	R=-0,6822 p=0,135
Bubrezi	R=-0,1429 p=0,787
Mozak	R=0,1987 p=0,706
Testisi	R=0,6985 p=0,123
Zubi	R=0,9532 p=0,003

R-koeficijent korelacije. p <0,05

5. DISKUSIJA

Na osnovu podataka iz epidemioloških, kliničkih i eksperimentalnih studija, evidentno je da prekomeran unos F^- može dovesti do različitih poremećaja u organizmu (Gessner i sar., 1994; Puty i sar., 2021; Meng i sar., 2021). Stoga su F^- predmet ispitivanja mnogobrojnih studija, radi utvrđivanja molekularskih mehanizama njihovog potencijalnog toksičnog dejstva, kao i radi evaluacije profilaktičkih koncentracija F^- . Sa druge strane, s obzirom da su F^- u svakodnevnoj upotrebi, njihova interakcija sa drugim elementima poslednjih godina je u centru pažnje, zbog mogućeg antagonizma i/ili sinergizma (Jinadasa i Dissanayake 1992; Mittal i Flora 2007).

Ova studija se sastoji od dve celine. Prva celina odnosi se na uticaj pet rastućih koncentracija F^- (opsega koncentracija koje se zaista mogu naći u okruženju) na krv, meka i čvrsta tkiva eksperimentalnih *Wistar* pacova nakon subakutne ekspozicije. Druga celina odnosi se na potencijalni protektivni uticaj Se kada je primenjen samostalno ili zajedno sa najvišom koncentracijom F^- .

Fluoridi se dodaju u vodu za piće u mnogim zemljama, još od 40-ih godina 20. veka, sa ciljem da protektivno deluju na incidencu karijesa zubnih tkiva (Guth i sar., 2021). Od samog početka upotrebe, F^- su bili i ostali jedna od najzastupljenih tema u oblasti javnog zdravlja širom sveta. Evropska agencija za bezbednost hrane (EFSA) je 2014. godine definisala nivo adekvatnog dnevnog unosa F^- koji iznosi 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m. pri čemu ova doza ispoljava maksimalni preventivni efekat i minimalni rizik za nastanak fluoroze zuba. U Evropi, prosečan unos F^- iz vode za piće iznosi 1,86 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m./dan, iz hrane 5-28 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m./dan, iz pasti za zube 1,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m./dan kod odraslih i 11,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m./dan kod dece (EFSA 2014). Fluoridi su prisutni svuda oko nas i njihov pozitivan uticaj na remineralizaciju gleđi je odavno utvrđen (Silverstone 1982; Sivapriya i sar., 2017). Ipak, kliničke, eksperimentalne i epidemiološke studije pokazale su da izloženost visokim koncentracijama F^- može poremetiti funkcionisanje organizma i dovesti do trovanja (Yu i sar., 2021; Illam i sar., 2021; Puty i sar., 2021). Voda i hrana su najzastupljeniji izvori F^- , ali koncentracije F^- u vazduhu i zemljištu pojedinih područja takođe su visoke usled zagađenja ili usled specifičnog mineralnog sastava tla, bogatog F^- (Cape i sar., 2003; Karthikeyan i Lakshmanan 2011; O'Mullane i sar., 2016; Lacson i sar., 2020). Takođe, u stomatologiji se upotrebljavaju različita profilaktička sredstva (paste za zube, gelovi i rastvori za lokalnu primenu) koja sadrže F^- , i doprinose njihovoj potencijalnoj akumulaciji u organizmu. Dakle, posebnu pažnju treba obratiti na njihovo moguće toksično delovanje usled pomenute akumulacije i izloženosti povišenim koncentracijama. Endemska fluoroza se manifestuje promenama na skeletu i zubnim tkivima kod ljudi i životinja (Choubisa 2012), zbog čega je većina studija, barem na početku, bila posvećena kalcifikovanim tkivima. Studije novijeg datuma se bave uticajem F^- i na druge organe, sa molekularnog i genetičkog aspekta (Tsunoda i sar., 2005; Picco i sar., 2014; Song i sar., 2017; Perera i sar., 2018). Ipak, podaci iz studija u kojima su ispitivani uticaji visokih koncentracija F^- na funkciju organizma su prilično različiti. Razlike u izveštajima se mogu pripisati: korišćenju različitih životinjskih modela, ćelijskih kultura, nehomogenosti ispitivane populacije kao i upotrebi različitih metoda za evaluaciju štetnih efekata F^- (Guth i sar., 2021). Poslednjih godina se čak i povećao broj naučnih publikacija koje ne preporučuju upotrebu F^- , posebno tokom trudnoće, i predlažu da F^- treba da budu kategorisani kao toksične supstance (Grandjean i Landrigan 2014; Guth i sar., 2020). Imajući u vidu aktuelnost ove teme, u našoj eksperimentalnoj studiji nameravali smo da ispitamo subakutne efekte F^- na krv, meka i čvrsta tkiva pacova, doznu zavisnost efekata, kao i granične subakutne toksične doze F^- , pomoću različitih mehanizama toksičnosti koji su obuhvatali OS i genotoksičnost kako bi dobili što preciznije podatke.

Selen predstavlja važan mikroelement za funkcionisanje organizma i ispoljava antioksidativna svojstva (Oldfield 2006; Lu i Holmgren 2009). Istraživanja su pokazala da Se ispoljava antagonističko delovanje u odnosu na povišene koncentracije F⁻, kao i da smanjuje OS i apoptozu ćelija izazvanih prekomernim unosom F⁻ (Wang i sar., 2018; Gao i sar., 2021). Iz tih razloga, drugi cilj eksperimenta bio je da ispitamo uticaj suplementacije Se kao i nivo potencijalnog smanjenja oštećenja tkiva izazvanih povišenom koncentracijom F⁻ kod pacova.

Cilj toksikološke studije jeste da identifikuje kritične koncentracije/doze određenog agensa, koje potencijalno mogu štetno uticati na ljude, životinje i biljke, odnosno na celokupan ekosistem. U te svrhe se studije izvode na eksperimentalnim životinjama, međutim, ovakve studije imaju ograničenja u vidu broja životinja, kao i broja različitih koncentracija/doza ispitivane supstance. Stoga, najbolji način da se prezentuje odnos doza-efekat jeste da se utvrde intervali pouzdanosti efekta supstance, umesto srednjih vrednosti (EFSA 2011; Jensen i sar., 2019). *Benchmark* metodologija je najbolja metoda za procenu odnosa doza-efekat, koja se prvi put pominje 80-ih godina, i danas postoje nove i poboljšane verzije ovog softvera (Crump 1984; Crump 1995; Wheeler i Bailer 2013). *Benchmark* metodologija se može primeniti na sve toksične efekte, i nastala je kao alternativa NOAEL-u, koji se bazira na identifikaciji najviše koncentracije određene supstance koja ne izaziva štetan efekat (EFSA 2017). U naučnom smislu, BMD je superiornija metoda u poređenju sa NOAEL pristupom, s obzirom da nam omogućava adekvatan prikaz doza-efekat odnosa, odnosno prikazuje najmanju koncentraciju supstance prilikom koje dolazi do određenog ispitivanog efekta (Antonijević i sar., 2019; Baralić i sar., 2020; Javorac i sar., 2021). Na osnovu rezultata iz literature, akutna toksičnost kod pacova ispoljava se nakon ekspozicije F⁻ u koncentraciji između 26 i 102 mg/kg t.m./dan, dok se hronična toksičnost ispoljava nakon ekspozicije F⁻ u koncentraciji između 4,3 i 7,6 mg/kg t.m./dan (NRC 2006). U okviru ove disertacije, koncentracije F⁻ (koje su dodate u vodu za piće) su iznosile: 10, 25, 50, 100 i 150 mg/l. S obzirom da je merena zapremina popijene vode po grupi, t.m. svakog pacova kao i koncentracija F⁻ u svakom tkivu, navedene koncentracije F⁻ koje su pacovi uneli u organizam su iznosile redom: 1,4; 3,5; 6,2; 13,6 i 19,15 mg/kg/dan.

5.1 Distribucija fluorida u tkivima

Merenjem koncentracija F⁻ u tkivima jetre, bubrega, slezine, mozga, testisa, zuba i femura, najviše vrednosti F⁻ su potvrđene u grupama pacova koje su pili vodu sa 50 i 100 mg/l F⁻, osim u zubima i femuru, gde je najviša vrednost potvrđena u grupi F 150 ppm. Povišene koncentracije F⁻ u tkivima jetre, bubrega, slezine, mozga, i femura zabeležene su i drugim studijama nakon ekspozicije F⁻ u koncentracijama većim od 10 ppm (Samanta i sar., 2016; McPherson i sar., 2018). U ovoj disertaciji, u tkivima jetre, bubrega, slezine, mozga i testisa grupe F 150 ppm, zabeležena je slična koncentracija F⁻ kao u tkivima kontrolne grupe. Ovakve rezultate možemo objasniti činjenicom da su navedena tkiva izuzetno prokrvljena kao i da je uočena akumulacija F⁻ u zubima i femuru. Posmatrajući disitribuciju u organima, najviša koncentracija F⁻ detektovana je u bubrezima, zubima i femuru. Ovakvi rezultati su očekivani, s obzirom da se F⁻ najviše deponuju u koštanim tkivima, dok se njihova ekskrecija uglavnom vrši pomoću bubrega (Daston i sar., 1985; de Carvalho i sar., 2006).

5.2 Telesna masa pacova i unos vode

Podaci iz prethodnih eksperimenata su pokazali da F⁻ mogu uticati na promenu t.m. eksperimentalnih životinja (Collins i sar., 1995; El-lethey i sar., 2010; Amaral i Azevedo 2018). Na primer, Amaral i Azevedo (2018) uočili su smanjenje t.m. kod miševa koji su tretirani sa 50 ppm F⁻, ali u njihovoj studiji životinje su bile tretirane duže vremena (11 nedelja) u odnosu na naš eksperiment. Zatim, Balaha i sar. (2021) su takođe zabeležili smanjenje prinosa t.m. kod pacova koji su bili izloženi F⁻, ali u značajno višim koncentracijama (500 ppm) tokom 60 dana. U okviru disertacije, najizraženije smanjenje prinosa t.m. je uočeno u grupama pacova koji su pili vodu sa

koncentracijama F^- većim od 25 mg/l nakon prve dve nedelje. Na kraju eksperimenta nije zabeležena promena t.m. ni u jednoj doznoj grupi u poređenju sa kontrolnom grupom, i ovi rezultati se poklapaju se određenim studijama (Chioca i sar., 2008; Catani i sar., 2010). Slično, Pereira i sar. (2011) nisu uočili promene prirasta t.m. kod pacova nakon ekspozicije F^- u dozi od 100 ppm tokom 30 dana. Zatim, u drugoj studiji nisu uočene promene u prinosu t.m. *Wistar* pacova koji su bili izloženi F^- u dozi od 20 ppm tokom 15, 30 i 60 dana (Perera i sar., 2018). Dakle, možemo pretpostaviti da PTM zavisi kako od koncentracije tako i od dužine ekspozicije F^- . Sa druge strane, smanjen unos vode je zabeležen u grupama koje su pile vodu sa koncentracijama F^- većim od 50 mg/l kao i u grupama sa Se. Najizraženija redukcija unosa vode kod pacova je zabeležena u grupi koja je pila vodu sa dodatim Se, tako da potencijalna dehidracija može biti uzrok promena pojedinih vrednosti parametara redoks statusa u ovoj grupi. Pojedini autori su ukazali da prilikom suplementacije Se (2 mg/l), eksperimentalne životinje piju manje vode, dok pri višim koncentracijama čak prestaju da piju vodu (Crespo i sar., 1993; Sieber i sar., 2011).

5.3 Uticaj fluorida na patohistološke promene tkiva pacova

Poslednjih godina sve je više istraživanja koja se bave uticajem F^- na visceralna tkiva - jetru, slezinu, bubrege, mozak, srce i dr. (Malin i sar., 2019; Grandjean 2019; Labib i sar., 2021). U eksperimentalnim studijama, *in vivo* i *in vitro*, različita tkiva i ćelijske linije su izlagani F^- sa ciljem da se utvrdi koje koncentracije F^- i u kojoj meri izazivaju patološke promene tkiva (Mendoza-Schulz i sar., 2009; Guo i sar., 2017; Li i sar., 2022). Histopatološkim analizama možemo uočiti promene tkiva kod ljudi i životinja koje nastaju kao posledica određenog oboljenja (Saukko i Pollak 2013). Promene koje se mogu uočiti histološkim ispitivanjima obuhvataju morfološke promene u tkivima ili ćelijskim strukturama, kao i patološku detrukciju ili infiltraciju inflamatornim i/ili tumorogenim ćelijama (Saukko i Pollak 2013). Histološka evaluacija tkiva se najčešće bazira na fiksaciji pomoću formalina i parafina i bojenju uzoraka hematoksilinom i eozinom (Foureau i sar., 2015), i ova metodologija je korišćena u okviru ove disertacije.

Jetra predstavlja važan organ čija je primarna uloga metabolizam i detoksikacija različitih supstanci (Sodani 2016). Pojedini autori su ukazali da subakutna ekspozicija visokim koncentracijama F^- oštećuje tkivo jetre kod različitih eksperimentalnih životinjskih modela, pri čemu je uočeno je oštećenje ćelijske membrane, citoplazme, abnormalan raspored hepatocita i vakuolarna degeneracija (Chattopadhyay i sar., 2011; Owumi i sar., 2019; Ouyang i sar., 2021; El-Megharbel i sar., 2021). U našoj *in vivo* studiji, histopatološke promene tkiva variraju zavisno od koncentracije F^- kojima su životinje bile izložene. Na histološkim preparatima jetre eksperimentalnih pacova, promene nisu uočene u grupi koja je pila vodu sa najnižom koncentracijom F^- (10 mg/l). Suprotno, pojedini autori su istakli da ista koncentracija F^- dovodi do hiperemije centralnih vena i edema tkiva jetre kod miševa, ali je vreme ekspozicije u navedenoj studiji bilo znatno duže (90 dana) (Ersan i sar., 2010). U ovoj disertaciji, u jetri pacova koji su pili vodu sa 25 mg/l F^- , uočeni su iregularan raspored hepatocita, dilatacija krvnih sudova i vaskularna kongestija, odnosno minimalna inflamacija na osnovu Knodelovog indeksa. I drugi autori ističu da nakon subakutne ekspozicije 25 ppm F^- u tkivu jetre nastaju intenzivna oštećenja-izrazita degeneracija hepatocita, inflamacija i infiltracija inflamatornim ćelijama (Thangapandiyani i Miltonprabu 2014). Zatim, Perera i sar. (2018) su istakli da i pri nižoj dozi od 20 ppm, F^- mogu da izazovu i veća oštećenja, tj., fokalnu nekrozu i portalnu inflamaciju nakon 30 dana ekspozicije. Na osnovu rezultata ove disertacije, intenzivnije promene u tkivu jetre su uočene u grupama pacova koji su pili vodu sa višim koncentracijama fluorida - 50, 100 i 150 mg/l, i nakon 28 dana u tkivima jetre uočena su piknotična jedra, dilatirani sinusoidi ispunjeni eritrocitima i zapaljenskim infiltratom, degeneracija citoplazme i hepatocita. Na osnovu rezultata Knodelovog indeksa, možemo reći da je oštećenje jetre najizraženije u grupama F 100 ppm i F 150 ppm i te promene možemo kategorisati kao blagu inflamaciju. Naši rezultati su slični rezultatima druge studije, gde je u jetri *Wistar* pacova koji su bili izloženi 100 ppm F^- tokom tri i šest nedelja,

uočena infiltracija mononuklearnih ćelija i perivaskularnih leukocita zajedno sa kongestijom krvnih sudova (Ali i sar., 2017). Promene u tkivu jetre pacova koji su pili vodu sa ovim koncentracijama F^- su i očekivane, s obzirom da jetra ima glavnu ulogu u detoksikaciji različitih ksenobiotika (Jarrar i Taib 2012; Sodani 2016). Histopatološke promene u jetri eksperimentalnih životinja nakon ekspozicije F^- mogu biti izazvane usled akumulacije slobodnih radikala (Thangapandiyan i Miltonprabu 2014), i smanjenja aktivnosti antioksidativnih enzima (Prakash i sar., 2018). U našoj eksperimentalnoj studiji, u tkivu jetre vrednosti O_2^- su bile povišene, zajedno sa vrednostima TOS, a zabeležena je i smanjena aktivnost SOD1. Zatim, u našoj studiji su uočene početne promene tkiva bubrega u vidu edema, hiperemije i vakuolizacije ćelija u grupi pacova koji su pili vodu sa 25 mg/l F^- . U drugoj studiji na eksperimentalnim miševima, izrazita oštećenja tkiva bubrega u vidu vakuolarne i granularne degeneracije uočena su nakon ekspozicije F^- u koncentracijama od 24 i 48 mg/kg (Luo i sar., 2017). U istoj studiji, disfunkcija bubrega je dokazana pomoću smanjene aktivnosti antioksidativnih enzima zaštite, uključujući CAT, GPx i SOD (Luo i sar., 2017). Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije, distribucija F^- u bubrezima je veća u odnosu na druga meka tkiva u svim eksperimentalnim grupama sa rastućim koncentracijama F^- . Najveća koncentracija F^- u bubrezima je zabeležena u grupama F 50 ppm i F 100 ppm. Ovakva distribucija se poklapa i sa histološkim rezultatima ove studije. Naime, na presecima bubrega grupa F 50 ppm i F 100 ppm uočena su intenzivna oštećenja - izrazita atrofija, degeneracija i nekroza glomerula, dilatacija i kongestija krvnih sudova. Zatim, u ovim grupama su zabeležene i neregularnosti hromatina i jedra u većini uzoraka, kao i ćelijski infiltrati. Promene u tkivu bubrega su najintenzivnije u grupi F 150 ppm u vidu hiperemije i edema, oštećenja krvnih sudova i atrofija glomerula u pojedinim uzorcima. S obzirom da je koncentracija F^- u bubrezima grupe F 150 ppm slična vrednostima kontrolne, na osnovu ovakvih rezultata možemo pretpostaviti da je usled ekspozicije visokoj koncentraciji F^- i posledičnog oštećenja došlo to ubrzanog metabolizma bubrega i ekskrecije F^- . Fluoridi mogu dovesti do oštećenja struktura nervnog sistema redukcijom antioksidativnog sistema zaštite i neurotransmitera, mogu izazvati i neurodegenerativne promene oštećenjem dendrita i sinaptičkih veza (Atmaca i sar., 2014; Shanmugam i sar., 2018; Charitha i sar., 2018). Na osnovu rezultata naše studije, na histološkim presecima mozga zabeležen je fiziološki nalaz tkiva u svim eksperimentalnim grupama u poređenju sa kontrolom. Pojedini autori su istakli da kod pacova tokom akutnih stresnih situacija može doći do podsticaja neuroproliferacije i smanjenja oštećenja (Kirby i sar., 2013). Zatim, proliferacija i diferencijacija neuralnih stem ćelija takođe može doprineti reparaciji oštećenja tkiva mozga (Sun 2014) i upravo ovakav mehanizam može biti potencijalno objašnjenje za rezultate naše studije. Pojedini autori smatraju da F^- ne treba da se smatraju za neurotoksične supstance (Guth i sar., 2020). Slezina predstavlja najveći organ imunog sistema i ima ključnu ulogu u imunološkoj odbrani organizma s obzirom da produkuje 20-25% ukupnih ćelija krvi (Podder i sar., 2010). Slezina sadrži brojne limfocite i makrofage, koji generišu različite citokine, uključujući interleukine i faktor nekroze tumora (TNF- α engl. *tumor necrosis alpha*) (Liu i sar., 2019). Oštećenje slezine usled ekspozicije visokim koncentracijama F^- prikazano je u brojnim *in vivo/in vitro* studijama (Krishnamoorthy i sar., 2015; Kuang i sar., 2016). Pojedini autori ističu da F^- u koncentraciji od 150 ppm nakon dužeg vremena ekspozicije (120 dana) izazivaju oštećenje splenocita - apoptozu i edem ćelija, dezintegraciju ćelijskih membrana i endoplazmatičnog retikuluma i vakuolizaciju mitohondrija (Liu i sar., 2019). U drugoj studiji je uočeno smanjenje bele pulpe slezine nakon ekspozicije fluoridima u koncentracijama od 15 i 150 ppm, subakutno i hronično (Podder i sar., 2010). Das i sar. (2006) su u okviru svoje studije u kojoj su tretirali *Wistar* pacove F^- (9 mg/l) pomoću oralne gavaže tokom 4 nedelje, uočili imunotoksičnost, usled nastanka OS i poremećene citoarhitektonike slezine. Ipak, na osnovu rezultata ove disertacije, u svim eksperimentalnim grupama je uočen fiziološki histološki nalaz tkiva slezine. Moguće objašnjenje za ovakav rezultat može biti činjenica da slezina poseduje visok regeneratorni potencijal (Fremont i Rice 2007). Slični rezultati su dobijeni u studiji gde su *Wistar* pacovi pili vodu sa 25 mg/kg/t.m./dan i nisu uočene značajne promene na histološkim preparatima slezine (Kumar i Kumari 2013). Na osnovu podataka iz literature, hronična ekspozicija F^- u koncentraciji od 100 mg/l dovodi do promena struktura gleđi zuba i koštanog tkiva (Yu i sar.,

2013; Feltrin-Souza i sar., 2021). U drugoj studiji, F⁻ u koncentraciji od 150 mg/l doveli su do fluorotičnih promena femura i sekutića kod *Wistar* pacova (Shi i sar., 2020). Suprotno, Turner i sar. (1995) su istakli da visoke doze F⁻ nisu uticale na mineralizaciju koštanih tkiva eksperimentalnih životinja. Rezultati naše studije su slični, odnosno, analizom zuba i femura pacova tretiranih F⁻, nisu uočene patohistološke promene. Dakle, možemo zaključiti da subakutna ekspozicija F⁻ ne utiče na promene morfologije zuba i femura pacova, uprkos evidentnoj akumulaciji. Takođe, makroskopskim pregledom sekutića i molara pacova nisu uočeni znaci lokalne fluoroze.

5.4 Uticaj selen na patohistološke promene tkiva pacova

Antagonistički odnos Se i povišenih koncentracija F⁻ zabeležen je kod različitih eksperimentalnih životinjskih modela (Helal i El Dakdoky 2006; Feng i sar., 2012; Wang i sar., 2018). *In vitro*, suplementacija Se je uticala na smanjenje morfoloških oštećenja tubularnih epitelnih ćelija (*NRK-52E*) bubrega (Gao i sar., 2021). Takođe, rezultati iz literature su pokazali da Se potencijalno utiče na smanjenje oštećenja hepatocita pacova usled ekspozicije F⁻ (Feng i sar., 2012). Kod eksperimentalnih pacova, pretpostavlja se da je optimalna antagonistička koncentracija natrijum-selenita u odnosu na toksičnost F⁻ u rasponu od 0,75 do 1,5 mg/l (Feng i sar., 2012; Qian i sar., 2013; Al-Harbi i sar., 2014). Ipak, na osnovu histopatoloških preseka jetre i bubrega pacova u ovoj studiji, nije došlo do interakcije između F⁻ i Se, odnosno, nije uočeno protektivno dejstvo Se na oštećenja izazvana F⁻. Dakle, blaga inflamacija je uočena u jetri i bubrezima pacova grupe koji su pili vodu sa kombinacijom 150 mg/l F⁻ i Se. Shearer i Ridlington (1976) takođe nisu uočili interakciju između F⁻ i više oblika natrijum-selenita u mekim ali i čvrstim tkivima. U našoj studiji, histološkom analizom tkiva pacova koji su konzumirali vodu sa samo dodatim Se, nisu uočena fiziološka odstupanja niti u jednom uzorku jetre, bubrega, slezine, mozga, zuba i femura u odnosu na kontrolnu grupu.

5.5 Uticaj fluorida na biomarkere redoks statusa kod pacova

Balans između oksidanasa i antioksidanasa je neophodan za funkcionisanje organizma. Oksidativni stres nastaje usled disbalansa između proizvodnje i eliminacije ROS (Forman i Zhang 2021). Reaktivne kiseonične vrste mogu oštetiti sve ćelijske elemente i dovesti do apoptoze ili nekroze (Forman i Zhang 2021). Faktori okruženja kao što su izloženost zagađujućim supstancama, lekovima itd. mogu dovesti do ovakvog disbalansa i stvaranja slobodnih radikala u visokoj koncentraciji (Pizzino i Irrera 2017). Oksidativni stres može doprineti nastanku hronične inflamacije i razvitku različitih oboljenja poput dijabetesa, neuroloških poremećaja i tumorogenih promena (Strunecka i Strunecky 2020). Mehanizmi toksičnosti F⁻ su kompleksni, i s obzirom da utiču na enzime, indukuju oštećenje ćelija i inflamaciju, mogu dovesti do nastanka OS (Barbier i sar., 2010). Zapravo, OS se smatra primarnim mehanizmom toksičnosti F⁻ (Tang i sar., 2021; Gao i sar., 2021; Angwa i sar., 2021). Mnogobrojna istraživanja su istakla da F⁻ mogu dovesti do nastanka ROS i smanjenja antioksidativnog potencijala (Ma i sar., 2017; Maheshwari i sar., 2021; Mondal i sar., 2021). Zatim, povišene koncentracije F⁻ utiču na regulaciju citokina, distribuciju bioelemenata i dovode do povećanja lipidne peroksidacije (Maity i sar., 2021; Lima i sar., 2021). *In vitro*, F⁻ indukuju vaskularno oštećenje endotelnih ćelija putem mehanizma nastanka OS (Ma i sar., 2017). Dalje, F⁻ mogu uticati na hormonski status, ekspresiju/aktivnost proteina, i indukovati genotoksičnost i citotoksičnost u različitim tkivima eksperimentalnih životinja (Kheradpisheh i sar., 2018; Guo i sar., 2020; Dionizio i sar., 2021). Fluoridi mogu oštetiti ćelijsku membranu i izazvati apoptozu, što je potvrđeno njihovim uticanjem na različite oksidativne i antioksidativne parametre, kao što su MDA, TAS, GP, SOD, CAT, i dr. (Inkielewicz-Stepniak i Czarnowski 2010; Zhou i sar., 2015; Lu i sar., 2017; Dec i sar., 2020). Jedna od hipoteza ove doktorske disertacije jeste da F⁻ mogu uticati na različite redoks parametre u tkivima pacova, a cilj je bio da se utvrdi da li postoji dozna zavisnost F⁻ na efekte promena kao i najmanja koncentracija F⁻ pri kojima dolazi do pojave OS.

Trovanje F⁻ može dovesti do povećanja lipidne peroksidacije (Ferreira i sar., 2021). Malondialdehid se često koristi kao marker lipidne peroksidacije u ćelijskim membranama, odnosno MDA predstavlja endogeni genotoksični proizvod lipidne peroksidacije koji se može detektovati u DNK molekulu, i njegove izmenjene vrednosti su u korelaciji sa brojnim patološkim stanjima (Niedernhofer i sar., 2003; Kong i sar., 2016). Različite analize su pokazale da je MDA pokazatelj mutagenosti kod bakterija i sisara, a pokazatelj kancerogenosti kod pacova (Mukai i Goldstein 1976; Basu i Marnett 1983; Niedernhofer i sar., 2003). Porast koncentracije MDA je moguć u situacijama kada antioksidativni enzimski sistem zaštite više nije u mogućnosti da adekvatno funkcioniše (Halliwell i Gutteridge 1986; Gutiérrez-Salinas 2006). Preciznije, oštećenje usled formiranja viška slobodnih radikala u ćelijskoj membrani nastaje kada glavni antioksidativni enzimi (najčešće u eritrocitima) počnu sa oštećenjem masnih kiselina (Morales-González i sar., 2010). Potencijalno, F⁻ direktno modifikuju aktivnost antioksidativnih enzima putem kompetitivne inhibicije substrata, usled strukturne sličnosti F⁻ i određenih substrata za oksidoreduktaze i jonske kontransportere ćelijskih membrana. Indirektno, F⁻ dovode do denaturacije proteina usled nastanka OS (Monsour i Kruger 1985; Li 2003; Agalakova i Gusev 2012; Mochidome i sar., 2013). U ovoj doktorskoj disertaciji, statistički značajno povišene vrednosti MDA su zabeležene u plazmi i mozgu grupa F 100 ppm i F 150 ppm. Slične vrednosti su uočene u krvi eksperimentalnih životinja, ali i kod dece sa hroničnom fluorozom (Kanbur i sar., 2009; Morales-González i sar., 2010; Miranda i sar., 2018; Tkachenko i sar., 2021; Ferreira i sar., 2021). Tkivo mozga je izuzetno osetljivo na OS, s obzirom da disbalans stvaranja i eliminacije ROS utiče na nivoe kalcijuma i glukoze i funkciju mitohondrija, koji su neophodni za kognitivne i bihevioralne funkcije (Salim 2017). Poznato je da F⁻ prolaze kroz krvno-moždanu barijeru (Grandjean 2019), i u našoj studiji su uticali na povećano stvaranje lipidne peroksidacije, odnosno uočen je trend porasta MDA vrednosti, koje mogu dovesti do povećane permeabilnosti. *In vitro*, F⁻ dovode do porasta MDA koncentracija u membrani eritrocita i utiču na aktivnost antioksidativnih enzima (Gutiérrez-Salinas i sar., 2013). Brojni autori su potvrdili povišen nivo MDA nakon ekspozicije F⁻ u tkivu bubrega, jetre i mozga kod različitih eksperimentalnih životinja (Błaszczuk i sar., 2008; Inkielewicz-Stepniak i Czarnowski 2010; Chattopadhyay i sar., 2011; Zhang i sar., 2013; Cao i sar., 2019; Oyagbemi i sar., 2021; Mondal i sar., 2021; El-Megharbel i sar., 2021). U našoj *in vivo* studiji, nisu uočena značajnija odstupanja MDA vrednosti nakon ekspozicije različitim koncentracijama F⁻ tokom 28 dana u bubrezima, dok se u jetri i slezini uočava trend opadanja MDA vrednosti. Zatim, na osnovu *Benchmark* analize, potvrđeni su dozno zavisni efekti F⁻ za povišene vrednosti MDA u plazmi i mozgu, ali i za snižene vrednosti MDA u jetri i slezini. Najniži BMDL za povišene vrednosti MDA iznosi 67,0 mg/l u plazmi i 0,1 mg/kg u mozgu, dok za snižene MDA vrednosti iznosi 1,1 mg/kg u jetri i 28,0 mg/kg u slezini.

Za razliku od lipida, reakcije proteina sa različitim oksidansima nisu mnogo proučavane niti korišćene. Ipak, poslednjih godina su sve učestalija istraživanja na ovu temu, i evidentno je da su amino-kiseline podložne oštećenjima izazvanim slobodnim radikalima. Oksidansi mogu poremetiti strukturu proteina i dovesti do njihove denaturacije i fragmentacije (Witko-Sarsat i sar., 1996). Karbonilacija proteina je bitan mehanizam modifikacije proteina koji nastaje usled oksidacije proteinskih ostataka (arginina, lizina, prolina) i ROS (Monnier i sar., 2011). Oksidativna modifikacija proteina je ireverzibilan proces čiji je biomarker AOPP. Uznepredovali produkti oksidacije proteina nastaju usled reakcije oksidanasa sa proteinima plazme i predstavljaju bitne komponente različitih patoloških procesa kao što su uremija, vaskularne bolesti (aneurizma abdominalne arterije, okluzivna bolest aorte, ateroskleroza itd.), hronična bubrežna insuficijencija (Witko-Sarsat i sar., 1996; Selmezi 2011; Grysczyńska i sar., 2017). Trenutno nema dovoljno podataka koji bi pokazali da li je i u kojoj meri AOPP pouzdan marker OS u mekim tkivima. Pojedini autori su istakli da je AOPP adekvatan biomarker za praćenje nastanka OS u jetri i bubrezima (Cao i sar., 2013; Zhao i sar., 2019). Statistički značajan porast AOPP vrednosti je zabeležen u serumu eksperimentalnih pacova nakon ekspozicije F⁻ (Oyagbemi i sar., 2018) i u plazmi ovaca i osoba sa područja gde se zapaža endemska fluoroza (Xiu-wen i sar., 2017). Suprotno, u plazmi *Wistar* pacova, nije uočena promena AOPP vrednosti nakon ekspozicije F⁻ (23, 50 i 100 ppm) tokom 30 i 90 dana (Zhong i sar., 2021). U okviru ove

disertacije, vrednosti AOPP markera u određenoj meri su povišene u svim tkivima grupa koje se pile vodu sa visokim koncentracijama F⁻. Najizraženije promene su zabeležene u bubrezima i mozgu pacova grupa F 100 ppm i F 150 ppm, i možemo reći da su ova dva tkiva pretrpela najveća oštećenja proteina. Slični rezultati su dobijeni u studiji gde su tokom 6 nedelja pacovi pili vodu sa 12 mg/l F⁻, gde je porast AOPP uočen u tkivu bubrega, ali i u jetri (Inkielewicz-Stepniak i Knap 2012). U ovoj disertaciji, na osnovu *Benchmark* analize, potvrđen je dozno-zavisnan efekat F⁻ za povišene AOPP vrednosti u bubrezima i najniži BMDL iznosi 6,5e-06 mg/kg.

Superoksidni anjon predstavlja aktivnu kiseoničnu vrstu koja se može detektovati u gotovo svim ćelijama, i neophodan je za biološko funkcionisanje organizma (Birnboim 1988). Superoksidni anjon se oslobađa iz ćelije kao „respiratorna eksplozija”, koja nastaje ubrzo nakon oštećenja ćelije (Birnboim 1988). Enzimski se generiše pomoću NAD(P)H i ksantin oksidaze (Madamanchi i sar., 2005). Neenzimski, O₂⁻ se generiše kada kiseonik reaguje sa redoks-aktivnim kompleksima (Madamanchi i sar., 2005), koji su najčešće poreklom iz respiratornog lanca mitohondrija (glavni izvor intracelularnog ROS-a) (Dubois-Deruy i sar., 2020). Ova reakcija podrazumeva vezivanje O₂⁻ za oksidovanu formu enzima (Fe³⁺) i oslobađanje molekularnog kiseonika. Zatim dolazi do ponovnog vezivanja O₂⁻ za redukovanu formu enzima (Fe²⁺) što rezultuje oslobađanjem vodonik peroksida i vraćanjem enzima u oksidovanu formu (Johnson i Giulivi 2005; Vucić i sar., 2006). Dakle, O₂⁻ je važan radikal za respiraciju mitohondrija ali i balansira imunskog sistema (Hayyan i sar., 2016). Zbog toga je važno utvrditi uticaj F⁻ na stvaranje O₂⁻. U okviru ove doktorske disertacije, statistički značajno povišene koncentracije O₂⁻ su uočene u plazmi, jetri, mozgu i testisima. U plazmi i jetri, O₂⁻ je značajno povišen u grupama sa nižim koncentracijama F⁻. Ipak, u mozgu i testisima, O₂⁻ je značajno povišen u grupama koje su pile vodu sa višim koncentracijama F⁻ (100 i 150 mg/l). Superoksidni anjon u slezini i bubrezima pacova svih doznih grupa pokazuje trend povišenih vrednosti u grupama sa visokim koncentracijama F⁻. Povišene koncentracije O₂⁻ su zabeležene i u ćelijama nervnog sistema pacova nakon ekspozicije F⁻ (Shuhua i sar., 2012). Zatim, prekomerno stvaranje O₂⁻ *in vivo* i *in vitro* je potvrđeno u β-ćelijama pankreasa i spermatozoidima miševa i pacova nakon ekspozicije F⁻ (Izquierdo-Vega i sar., 2008; García-Montalvo i sar., 2009). U našoj studiji, na osnovu *Benchmark* analize, potvrđeni su dozno zavisni efekti F⁻ za povišene vrednosti O₂⁻ u plazmi, mozgu i jetri. Najniži BMDL za povišene vrednosti O₂⁻ u plazmi iznosi 5,2 mg/kg, 0,003 mg/kg u mozgu i 0,003 mg/kg u jetri.

Poremećaj oksidativnog/antioksidativnog balansa može rezultirati i izmenjenom aktivnošću antioksidativnih enzima (Inkielewicz-Stepniak i Czarnowski 2010). Totalni oksidativni status predstavlja sistemski nivo oksidacije organizma (Erel 2005). Kod pacijenata sa endemskom fluorozom, uočene su povišene vrednosti TOS koje su u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom F⁻ u urinu (Varol i sar., 2013). Ispitivanjem populacije koja je pila vodu sa granično visokim dozama F⁻ (1,7 ± 0,27 mg/l), detektovan je OS, pri čemu je TOS bio povišen (Kirit i sar., 2020). Povišene vrednosti TOS u krvi su uočene i kod eksperimentalnih pacova nakon ekspozicije F⁻ u koncentraciji od 150 ppm (Öner i sar., 2020). U okviru naše studije, trend povišenih vrednosti TOS uočeno je u plazmi, bubrezima, i mozgu pacova grupe F 150 ppm, ali bez statističke značajnosti. Ipak, u jetri su naizraženiji promene ovog markera, gde je značajan porast TOS uočeno u doznim grupama sa 25, 50 i 150 mg/l F⁻. Takođe, uočeno je trend opadanja vrednosti TOS u testisima, i na osnovu *Benchmark* analize, potvrđeni su dozno-zavisni efekti fluorida za snižene vrednosti TOS u testisima, pri čemu najniži BMDL iznosi 0,2 mg/kg. Hronična ekspozicija visokim koncentracijama F⁻ dovodi do smanjenja totalnog antioksidativnog statusa kod *Wistar* parova (Öner i sar., 2020). Na istom eksperimentalnom životinjskom modelu, pokazano je da i subakutna ekspozicija F⁻ u koncentraciji od 25 mg/l utiče na smanjenje TAS u serumu, jetri, bubrezima i mozgu (Inkielewicz-Stepniak i Czarnowski 2010). Rezultati jedne epidemiološke studije su pokazali da u krvi osoba koje su pile vodu sa povišenim dozama F⁻, vrednosti TAS su u značajnom padu (Kirit i sar., 2020). Ipak, u našoj *in vivo* studiji, u jetri pacova doznih grupa uočeno je trend povišenih vrednosti TAS. Na osnovu *Benchmark* analize, potvrđeni su dozno zavisni efekti F⁻ za povišene vrednosti TAS u jetri, pri čemu najniži BMDL iznosi 0,001 mg/kg. Dakle, ako imamo u vidu da je uočeno disbalans pojedinačnih

biomarkera antioksidativne zaštite ali ne i TAS, možemo zaključiti da TAS nije adekvatan marker za procenu uticaja F⁻ na redoks status.

Endogeni antioksidativni sistem zaštite se sastoji od različitih molekula i enzima, u koje spadaju SOD (SOD1, SOD2, SOD3), GPx, CAT, tiredotsin peroksidaza itd. (Sena i sar., 2018). Kod ljudi postoje tri vrste SOD: citoplazmatska CuZn (SOD1), mitohondrijalna Mn (SOD2) i ekstracelularna CuZn (SOD3). SOD1 (CuZn SOD) predstavlja važan metaloenzim koji je visoko eksprimiran u eukariotskim ćelijama, može se detektovati u citoplazmi, nuklearnim komponentama, lizozomima (Roychowdhury i sar., 2019; Tanwir i sar., 2021; Forman i Zhang 2021). Smanjene SOD aktivnosti u mozgu i poremećene kognitivne sposobnosti su uočene kod pacova koji su bili hronično izloženi visokim dozama F⁻ (Sharma i sar., 2021; Ran i sar., 2021). Slične promene su detektovane i u drugim tkivima, pa su tako redukovana SOD aktivnost i patološka morfologija jetre pacova detektovane nakon ekspozicije F⁻ u koncentraciji od 150 ppm (Li i sar., 2021). Ovakvi rezultati su slični rezultatima ove disertacije, gde je statistički značajno manja SOD1 aktivnost uočena u tkivima jetre i testisa, dok je u tkivima slezine primećen blagi pad SOD1 aktivnosti u odnosu na kontrolu, ali bez značajnosti. U jetri je značajan pad SOD1 aktivnosti uočena u svim doznim grupama, najviše u grupi koja je pila vodu sa 10 mg/l F⁻. Redukovane SOD1, GP, CAT aktivnosti i SOD1 mRNA ekspresija su detektovane i u jetri drugih životinjskih modela (Zhan i sar., 2006; Lu i sar., 2017). Pojedini autori su istakli da u tkivima testisa i epididimisa, 50 i 10 ppm F⁻ je uzrokovalo nastanak OS smanjenjem CAT, GPx i SOD aktivnosti (Sun i sar., 2018; Adelakun i sar., 2021), i slični rezultati su uočeni i u našoj studiji, gde je značajan pad SOD1 aktivnosti uočena u testisima pacova grupa F 100 ppm i F 150 ppm. Ipak, značajno povišena SOD1 aktivnost uočena je u bubrezima i mozgu pacova grupe F 150 ppm u okviru naše studije. Možemo pretpostaviti da je u ovim tkivima došlo do aktivacije kompenzatornog odbrambenog mehanizma protiv subakutnog oksidativnog oštećenja (Peng i sar., 2016) i da je usled disbalansa kiseonika i vodonik peroksida došlo do oštećenja ćelija, što je rezultiralo povišenom aktivnošću SOD1 (Peng i sar., 2016). Zatim, u okviru naše studije, nisu uočene značajne promene aktivnosti SOD1 u krvi pacova svih doznih grupa. Slični rezultati su dobijeni u drugoj studiji, gde nakon hronične ekspozicije F⁻ (10 i 50 mg/l) takođe nije uočena promena SOD1 aktivnosti u perifernoj krvi miševa (Miranda i sar., 2018). U ovoj disertaciji, na osnovu *Benchmark* analize, potvrđeni su dozno zavisni efekti F⁻ za povišenu SOD1 aktivnost u bubrezima i za sniženu SOD1 aktivnost u testisima. Najniži BMDL za povišenu SOD1 aktivnost u bubrezima iznosi 31,1 mg/kg, dok za sniženu SOD1 aktivnost u testisima iznosi 1e-04 mg/kg.

Sulfhidrilne grupe su sastavni deo različitih bioloških procesa, kao što su membranski transport i permeabilnost, transport elektrona, oksidativna fosforilacija i apoptoza (Abdulle i sar., 2020). Sulfhidrilne grupe su bitne za proces uklanjanja ROS (Mahajan i sar., 2018) i razvoj OS može uticati na nivo SH grupa putem direktne oksidacije (Bindoli i Rigobello 2002). *In vitro*, snižen nivo SH grupa u mitohondrijama uočena je nakon ekspozicije F⁻ (6 µM) (Dlugosz i sar., 2009). *In vivo*, snižene vrednosti SH grupa uočene su u plazmi i mozgu mužjaka *Wistar* pacova koji su tokom 180 dana pili vodu sa 50 i 100 mg/l F⁻ (Sharma i sar., 2021). U okviru našeg eksperimenta, značajno snižene vrednosti SH grupa su uočene u bubrezima, mozgu i testisima, dok je u krvi, jetri i slezini prisutan trend smanjenja vrednosti SH grupa. Na osnovu *Benchmark* analize, potvrđeni su dozno zavisni efekti F⁻ za snižene vrednosti SH grupa i najniži BDML u jetri iznosi 0,8 mg/kg, u bubrezima 0,002 mg/kg, u mozgu 12,0 mg/kg odnosno 0,5 mg/kg i u slezini 60,1 mg/kg.

Dozno zavisno sniženje vrednosti SH grupa u mozgu je u korelaciji i sa eksternim koncentracijama i sa internim koncentracijama F⁻. Dozno zavisno sniženje SOD1 aktivnosti u testisima je u korelaciji i sa eksternim koncentracijama i sa internim koncentracijama F⁻. Dakle, možemo zaključiti da su krv, jetra, bubrezi, mozak i testisi dozno zavisno osetljivi na ekspoziciju F⁻, i da su prve promene parametara redoks statusa uočene i pri minimalnim koncentracijama.

5.6 Uticaj selena na biomarkere redoks statusa kod pacova

Zaštitni antioksidativni sistem je neophodan za eliminaciju viška slobodnih radikala (Shahidi 2015). Antioksidanti se mogu podeliti u dve grupe: enzime koji predstavljaju primarnu liniju zaštite (SOD, GSH, CAT itd.) i neenzimske antioksidanse odnosno, sekundarnu liniju zaštite. U neenzimske antioksidanse spadaju protein-specifične oksidoreduktaze (feritin, albumin, tioli, vitamini E i C, β -karoteni itd.) (Matés i sar., 1999; Dobutovic i sar., 2014; Nikolic i sar., 2014; Irato i Santovito 2021). Poslednjih godina, Se je u centru istraživanja zbog svojih antioksidativnih osobina, i evidentno je da zajedno sa svojim metabolitima može pozitivno uticati na pojavu i razvoj različitih poremećaja i oboljenja kod ljudi (Tinggi 2008).

Selen je esencijalni bioelement i predstavlja izuzetno potentan antioksidans, koji pomoću više od 30 selenoproteina smanjuje oštećenja ćelija (Tinggi 2008; Aaseth i sar., 2021; Kim i sar., 2021). Poslednjih godina, sve su učestalije studije koje se bave ispitivanjem potencijalnih antioksidanasa i njihovog dejstva na promene izazvane različitim koncentracijama F^- . Na primer, analizom tubularnih ćelija bubrega pacova, utvrđeno je da suplementacija Se utiče na aktivnost SOD i vrednosti MDA, GSH i NO i redukuje OS izazvan F^- (Gao i sar., 2021). Dodavanje Se u hranu eksperimentalnih životinja može smanjiti povišene ROS vrednosti i oštećenje tankog creva nastalih usled ekspozicije visokim koncentracijama F^- (Ju i sar., 2021). U okviru analiza naše *in vivo* studije je pokazano da samostalno suplementiran Se nije uticao na pojedine redoks parametre u plazmi, bubrezima i testisima. Zatim, u Se grupi, primećene su značajno snižene vrednosti SH grupa u bubrezima i jetri, povišene vrednosti SH grupa u mozgu, kao i povišene vrednosti $O_2^{\cdot-}$ u testisima, TOS u mozgu i AOPP u bubrezima. Ipak, u našoj studiji su zabeleženi i pozitivni efekti suplementacije Se, najviše u tkivu mozga. Na osnovu podataka iz literature, Se ispoljava protektivni efekat na funkcije metaboličkih enzima i nastanak lipidne peroksidacije nakon ekspozicije različitim koncentracijama F^- u mozgu eksperimentalnih životinja (Reddy i sar., 2009; Basha i Madhusudhan 2010). U našoj studiji, suplementacija Se je takođe redukovala povišene MDA vrednosti u tkivu mozga. Zatim, u krvi je suplementacija Se smanjila povišene MDA vrednosti. Slični rezultati su dobijeni u studiji gde je suplementacija Se ($6,3 \mu M$) značajno smanjila povišene vrednosti ROS i MDA u krvi i tkivima životinja koje su konzumirale vodu sa 50 ppm F^- tokom tri nedelje (Chouhan i sar., 2013). Brojne studije pokazale su da Se pozitivno utiče na izmenjenu aktivnost SOD u jetri nakon ekspozicije F^- (Chen i sar., 2013; Miao i sar., 2013). U našoj studiji, Se nije značajno uticao na aktivnosti izmenjene aktivnosti SOD1 u jetri, slezini i testisima nakon ekspozicije F^- , ali je redukovao povišene SOD1 aktivnosti u mozgu i bubrezima pacova. Kada su u pitanju SH grupe, Se u kombinaciji sa F^- nije uticao na njihove vrednosti u bubrezima pacova.

5.7 Uticaj fluorida na bioelemente kod pacova

Bioelementi su neophodni za adekvatno funkcionisanje organizma i njihov disbalans može dovesti do različitih oboljenja i poremećaja (Vogel-González i sar., 2021; Błażewicz i sar., 2021; Forte i sar., 2021). Mikroelementi kao što su Cu, Zn, Fe, Mn i Se predstavljaju neizostavne komponente balansirane ishrane ljudi i životinja (Nieder i sar., 2018). Navedeni mikroelementi su važni za homeostazu organizma i njihov disbalans može uticati na sve sisteme organa (Li i sar., 2020). Ipak, bioelementi u povišenim dozama mogu biti toksični, a njihov deficit dovodi do različitih poremećaja organizma (McKinley i sar., 2019). Zatim, oni utiču na regulaciju DNK transkripcije i predstavljaju kofaktore različitih enzima (Ames 2001). Bioelementi poseduju i antioksidativna svojstva, odnosno sposobnost da eliminišu slobodne radikale (Shenkin 2006). Kada je u pitanju usna duplja, navedeni bioelementi imaju pozitivan uticaj na očuvanje oralnog zdravlja, s obzirom da imaju antibakterijska svojstva i utiču na mineralizaciju dentalnog biofilma. Cink učestvuje u procesima demineralizacije i remineralizacije, dok Cu i Fe poseduju anti-karijesna svojstva (Lynch i Duckworth

2020). Interakcija između F^- i pojedinih bioelemenata je uočena u uzorcima urina, seruma, mekih i kalcifikovanih tkiva eksperimentalnih životinja (Mazurek-Mochol 2002; Mou i sar., 2004; Karademir 2010). Ipak, evidentan je nedostatak podataka koji se tiču uticaja F^- (posebno nakon subakutne ekspozicije) na koncentracije Zn, Cu, Mn i Fe u različitim tkivima. Po našim saznanjima, ovo je prva eksperimentalna studija koja je obuhvatila procenu efekta pet rastućih koncentracija F^- na Zn, Cu, Fe i Mn u krvi, mekim (jetra, slezina, bubrezi, mozak i testisi) i kalcifikovanim tkivima (zubi i femur).

5.7.1 Uticaj fluorida na koncentracije bioelemenata u mekim tkivima eksperimentalnih životinja

Uticaj F^- na bioelemente još uvek je nedovoljno istražen. Na osnovu podataka iz jedne novije studije, u serumu dece koja boluju od hronične endemske fluorozе koncentracije Cu i Zn su snižene, dok su koncentracije Fe povišene, i ovakvi rezultati mogu biti u korelaciji na nastankom OS (Tkachenko i sar., 2021). U drugoj epidemiološkoj studiji koja je za ispitanike uključila takođe decu sa endemskom fluorozom, koncentracije Zn u serumu su takođe snižene, ali su koncentracije Cu povišene (Khandare i sar., 2018). Analizom studija na eksperimentalnim životinjama, takođe su zabeleženi različiti podaci. Nakon hronične ekspozicije F^- u koncentraciji od 25 ppm, uočen je povišen nivo Zn i nepromenjen nivo Cu u bubrežima ovaca sa fluorozom (Singh i Kanwar 1981; Çetin i Yur 2016). U ovoj doktorskoj disertaciji, koncentracije Zn u krvi, jetri, slezini, bubrežima i testisima su povišene u odnosu na kontrolu, dok su u mozgu koncentracije Zn snižene. Statistički gledano, značajne promene Zn su zabeležene u jetri, bubrežima, slezini i testisima, dok promene Zn u krvi i mozgu nisu statistički značajne, ali je prisutan trend porasta odnosno smanjenja koncentracija. U ovoj studiji, na osnovu *Benchmark* analize, potvrđeni su dozno zavisni efekti F^- za povišene koncentracije Zn u jetri i bubrežima, i najniži BMDL u jetri iznosi 7,3 mg/kg, dok u bubrežima iznosi 47,8 mg/kg. U našoj studiji koncentracije Cu su statistički značajno povišene u krvi i testisima, a statistički značajno snižene u jetri i mozgu. Međutim, u pojedinim organima su koncentracije bioelemenata i snižene i povišene, zavisno od koncentracije F^- koja je dodata u vodu za piće. U slezini, prilikom ekspozicije manjim koncentracijama F^- , prisutan je trend porasta koncentracija Cu dok je prilikom ekspozicije višim koncentracijama F^- prisutan trend smanjenja koncentracija Cu. U bubrežima je pri nižim koncentracijama F^- prisutan trend porasta koncentracija Cu dok je pri višim koncentracijama F^- prisutan trend smanjena koncentracija Cu. U ovoj disertaciji, na osnovu *Benchmark* analize, potvrđeni su dozno zavisni efekti F^- za povišene koncentracije Cu u krvi i za snižene koncentracije Cu u jetri, bubrežima i slezini. Najniži BMDL u krvi iznosi $2e-04$ mg/l, u jetri 29,8 mg/kg, u bubrežima 28,1 mg/kg, i u slezini 15,3 mg/kg. Pojedini autori su pokazali da F^- utiču na pad koncentracija Cu i Zn u jetri i femuru (Kanwar i Singh 1981; Kanwar i Singh 1981). Nedostatak Cu može uticati na transport Fe i sintezu hemoglobina, dok je nedostatak Zn u jetri u korelaciji sa patološkim oboljenjima ovog tkiva (Matak i sar., 2013; Omran i sar., 2017). Promene u metabolizmu Fe mogu izazvati različite poremećaje (Mulevicicene i sar., 2018; Chung i sar., 2018), a pojedini autori ističu da F^- mogu dovesti do hematoloških promena i anemije (Aziz i Masad 2013; Abbas i sar., 2017). Takođe, F^- mogu direktno uticati na porast koncentracije Fe u jetri i kostima (Krasowska i Włostowski 1992). U našoj studiji, koncentracije Fe su značajno smanjene u bubrežima i mozgu, značajno povišene u testisima, dok je u krvi i slezini uočen trend porasta koncentracija Fe. Na osnovu *Benchmark* analize, potvrđeni su dozno zavisni efekti F^- za snižene koncentracije Fe u bubrežima i mozgu. Najniži BMDL u bubrežima iznosi 7,4 mg/kg dok u mozgu iznosi $6e-04$ mg/kg. Mangan učestvuje u procesima aktivacije enzima i sastavni je deo različitih metaloenzima (Dogan 2018). U novijoj epidemiološkoj studiji pokazano je da se nivo Mn u serumu dece sa hroničnom fluorozom ne razlikuje od vrednosti Mn u serumu zdrave dece (Tkachenko i sar., 2021). U našoj *in vivo* studiji su dobijeni slični rezultati, koncentracije Mn u krvi svih doznih grupa su slične vrednostima kontrolne grupe. U epidemiološkoj studiji gde su ispitanici takođe bila deca, pokazano je da su povišene koncentracije Mn u direktnoj korelaciji sa povišenom incidencom karijesa kod dece (Tsanidou i sar., 2015). Na osnovu rezultata naše studije, u jetri je uočen porast Mn dok je u bubrežima

uočen značajan pad koncentracija Mn. Na osnovu *Benchmark* analize, potvrđeni su dozno zavisni efekti F⁻ za povišene koncentracije Mn u jetri i za snižene koncentracije Mn u bubrezima. Najniži BMDL u jetri iznosi 0,05 mg/kg dok u bubrezima iznosi 83,1 mg/kg.

5.7.2 Uticaj fluorida na koncentracije bioeleminata u kalcifikovanim tkivima eksperimentalnih životinja

Kalcifikovana tkiva su glavna mesta deponovanja F⁻ (Chachra i sar., 2008), samim tim smo pretpostavili da će u zubima i femuru doći do disbalansa koncentracija bioeleminata nakon ekspozicije F⁻. Cink se deponuje pretežno u mekim tkivima (prostata, bubrezi, jetra), ali donekle i u kalcifikovanim (Dogan 2018). U ovoj studiji, uočen je trend pada koncentracije Zn u zubima. Slični rezultati su dobijeni u studiji gde su *Wistar* pacovi bili izloženi F⁻ tokom 12 nedelja, nakon čega je došlo do smanjenja koncentracije Zn (Mazurek-Mochol 2002). Poznato je da smanjene vrednosti Zn mogu predstavljati faktor rizika za nastanak različitih oboljenja usne duplje (Dogan 2018). U našoj studiji, uočen je trend porasta koncentracija Fe u zubima. Pojedini autori su istakli da Fe može imati uticaja na smanjenje incidence karijesa, odnosno da redukuje remineralizaciju gleđi (Xavier i sar., 2015; Tsanidou i sar., 2015), te možemo zaključiti da su u našoj studiji povišene koncentracije F⁻ u direktnoj korelaciji da vrednostima Fe. Zatim, koncentracije Cu u femuru su snižene u svim eksperimentalnim grupama, statistički najznačajnije u grupama sa najvišim koncentracijama F⁻. Koncentracije Zn u femuru su povišene, statistički značajno u grupama sa srednjim koncentracijama F⁻. Slični rezultati su dobijeni u studiji gde su pacovi bili izloženi F⁻ putem vode, u koncentracijama od 100 i 200 mg/l, gde je uočen porast koncentracija Zn i smanjenje Cu (Krasowska i Włostowski 1992). Na osnovu *Benchmark* analize, potvrđeni su dozno zavisni efekti F⁻ za snižene koncentracije Zn u zubima i za snižene koncentracije Cu u femuru. Najniži BMDL u zubima za smanjenje Zn iznosi 21,0 mg/kg, u femuru za smanjenje Cu iznosi 1,6 mg/kg.

5.8 Efekat suplementacije selenom na bioelemente kod eksperimentalnih životinja

5.8.1. Efekat suplementacije selenom na koncentracije bioeleminata u mekim tkivima

U našoj studiji, uticaj Se na koncentracije bioeleminata je dvojak. U krvi pacova grupe F 150 ppm+Se, koncentracije Cu i Zn su slične koncentracijama kontrolne grupe. Međutim, u jetri su koncentracije Cu i Fe značajno više, a koncentracije Zn značajno niže u grupi F 150 ppm+Se u poređenju sa Se grupom, i možemo reći da je u ovom organu došlo do sinergizma Se i F⁻. Zatim, u bubrezima grupe F 150 ppm+Se koncentracije Cu su značajno niže u odnosu na Se grupu. U grupi pacova koji su pili vodu sa suplementiranim Se, uočeni su brojni disbalansi bioeleminata u različitim organima. Selen je značajno uticao na porast koncentracije Cu, Zn, Fe i Mn u krvi, smanjenje Cu i Fe i povećanje Zn i Mn u jetri, povećanje Zn u slezini, smanjenje Zn i Fe u bubrezima i mozgu, povećanje Zn u testisima. Ovakvi rezultati ukazuju na interakcije između samih bioeleminata kada se unose u povišenim dozama. I druge studije su ukazale na interakciju Se sa različitim bioelementima. Na primer, u jednoj studiji niska koncentracija Se (0,5 mg/kg t.m./dan) je nakon dve nedelje uticala na porast koncentracija Cu u krvi i urinu, porast Zn u krvi, srcu, mozgu i želudcu i smanjenje Zn u bubrezima pacova (Chmielnicka i sar., 1985). Dakle, imajući u vidu i naše rezultate, možemo zaključiti da Se može delovati dvojako. U našoj studiji je Se uticao na Mn, odnosno, samostalno suplementiran, ali u kombinaciji sa F⁻, Se je povisio koncentracije Mn u krvi, jetri i testisima. Tačnije, Se može ispoljiti pozitivna, ali i štetna biološka dejstva, u zavisnosti od doze, načina administracije, dužine ekspozicije i od organizma. (Lee i Jeong 2012; Karunasinghe i Ferguson 2017).

5.8.2. Efekat suplementacije selenom na koncentracije bioelemenata u kalcifikovanim tkivima

Analizom kalcifikovanih tkiva, jedina značajna interakcija između Se i F⁻ je uočena u femuru, gde je njihova ko-administracija dovela do smanjenja koncentracija Cu u odnosu na kontrolnu grupu. Samostalno suplementiran, Se je uticao na porast koncentracija Zn u zubima. Dakle, možemo reći da Se nije značajno uticao na vrednosti bioelemenata u zubima i femuru pacova suplementiran samostalno ili u kombinaciji sa F⁻, odnosno, uticaj Se na bioelemente je izraženiji u mekim tkivima.

5.9 Genotoksičnost fluorida

Različiti agensi koji se nalaze u našoj okolini, mogu negativno uticati na DNK molekul i doprineti njegovom oštećenju (Kolarević 2014). Ukoliko dođe do oštećenja DNK molekula (genoma/epigenoma), jedan od mogućih ishoda jeste i aktivacija reparatornih mehanizma (DDR engl. *DNA damage response*), i u zavisnosti od vrste oštećenja (modifikacija baza, jednolančani/dvolančani prekidi itd.) aktiviraju se i različiti reparatorni mehanizmi, kao što su reparacija baza, prekida DNK lanaca, nukleotida, unakrsna reparacija itd. (Chatterjee i Walker 2017; Agarwal i Miller 2017). Međutim, ukoliko je delovanje agensa isuviše intenzivno i ne dođe do reparacije DNK oštećenja, mogu nastati različite mutacije ćelija celokupnog organizma (Kolarević 2014). Komet test predstavlja jedan od najčešće korišćenih testova za detekciju DNK oštećenja u eukariotskim ćelijama. Prve verzije komet testa datiraju još iz 80-ih godina (Ostling i Johanson 1984), da bi se kasnije razvile alkalna (najzastupljenija) (Singh i sar., 1988; Collins i Dusinská 2002) i neutralna varijanta komet testa (Collins i Dusinská 2002). Komet test ima veliki značaj u posmatranju delovanja različitih toksina na prirodu, biljke, životinje i ljude, koristi se za procenu genotoksičnosti novih hemikalija, kao i za detekciju DNK oštećenja i reparacije. Komet test je ekonomična, brza, senzitivna metoda i ima široku upotrebu u naučnoj zajednici (Collins 2004).

Na osnovu pojedinih studija u kojima su analizirana različita tkiva eksperimentalnih životinja, uočeno je da visoke koncentracije F⁻ imaju negativan uticaj na funkcionisanje organizma (Tsunoda i sar., 2005; Song i sar., 2017; Perera i sar., 2018; Wei i sar., 2019). Novija istraživanja su potvrdila genotoksičnost F⁻, tačnije da F⁻ dovode do stvaranja OS (Sun i sar., 2014), disfunkcije mitohondrija (Ribeiro i sar., 2017), malformacija DNK i hromozoma različitih ćelija (Podder i sar., 2011; Manivannan i sar., 2013). Ipak, kada su u pitanju studije koje se tiču genotoksičnog potencijala F⁻, rezultati su različiti. Na primer, Ribeiro i sar. (2006) su istakli da F⁻ ne izazivaju DNK oštećenje limfocita kod miševa. U drugoj studiji je pokazano da F⁻ u koncentraciji od 150 ppm ne utiču na antioksidativne enzime krvi i ne izazivaju OS na modelu eksperimentalnih zečeva (Reddy i sar., 2003). Sa druge strane, pojedini autori ističu da izloženost F⁻ izaziva DNK oštećenje ćelija kostne srži, bubrega i jetre, kao i da F⁻ modifikuju ekspresiju proteina (Manivannan i sar., 2013; Yue i sar., 2020). Na osnovu rezultata komet testa, F⁻ u koncentraciji od 150 mg/l administrirani putem vode za piće dovode do DNK oštećenja hepatocita pacova (He i Chen 2006). Pojedini autori su istakli da je stepen DNK oštećenja hepatocita *Wistar* pacova nakon subakutne ekspozicije F⁻ u koncentraciji od 100 ppm, veći nakon četvarte nedelje eksperimenta, u odnosu na osmu nedelju ekspozicije (Liang i sar., 2018). U ovoj disertaciji oštećenje hepatocita je uočeno u svim eksperimentalnim grupama sa rastućim koncentracijama F⁻. Trebalo bi istaći da je najveće oštećenje hepatocita uočeno u grupi sa najmanjom koncentracijom F⁻ (10 mg/l), kao i da u grupama sa rastućim koncentracijama F⁻ stepen oštećenja opada. *In vitro*, visoke koncentracije F⁻ imaju sposobnost da redukuju aktivaciju i proliferaciju T i B limfocita slezine, čime F⁻ direktno utiču na zaštitnu imunsku funkciju slezine (Kuang i sar., 2016). Liu i sar., (2019) su takođe potvrdili uticaj F⁻ u koncentraciji od 150 ppm na DNK splenocita pomoću komet testa. Ista koncentracija F⁻ je i u našoj studiji uzrokovala najveća oštećenja splenocita. Statistički značajna oštećenja ćelija slezine su uočena i u svim drugim eksperimentalnim grupama pacova koji su pili vodu sa F⁻. Takođe, na osnovu *Benchmark* analize, potvrđeni su dozno zavisni efekti F⁻ za povišen intenzitet repa kometa u slezini, pri čemu najniži

BMDL iznosi 0,0 mg/kg. Pojedina istraživanja ističu da su koncentracije F⁻ u Evropi u granicama optimalnih kao i da F⁻ nisu neurotoksični (Guth i sar., 2020). Međutim, druga epidemiološka studija ukazuje na neurotoksični potencijal F⁻, i da je evidentno da visoke koncentracije F⁻, koje se prirodno nalaze u podzemnim vodama, imaju uticaj na količnik inteligencije kod dece (Grandjean 2019). Eksperimentalne studije su takođe konfrontirajuće, pa tako u pojedinim studijama F⁻ nisu prouzrokovali neuronalno DNK oštećenje, na osnovu rezultata komet testa (Ribeiro i sar., 2004). Ipak, veći je broj eksperimentalnih studija koje ukazuju na potencijalne probleme u funkcionisanju nervnog sistema koje mogu F⁻ izazvati. Pokazano je da F⁻, čak i u nižim koncentracijama mogu dovesti do patoloških lezija mozga, i do poremećaja pamćenja i učenja kod miševa i pacova (Cao i sar., 2019; Bartos i sar., 2019). U našoj studiji je evidentno DNK oštećenje mozga u svim grupama sa rastućim koncentracijama F⁻, i statistički gledano, najveća oštećenja su registrovana u grupi koja je pila vodu sa 150 mg/l F⁻. Takođe, analizom tkiva testisa smo uočili DNK oštećenja u svim eksperimentalnim grupama, statistički najznačajnije u grupi koja je pila vodu sa 50 mg/l F⁻. Na osnovu *Benchmark* analize, potvrđeni su dozno zavisni efekti F⁻ za povišen intenzitet repa kometa u testisima, pri čemu najniži BMDL iznosi 1e-04 mg/kg. Naši rezultati su slični rezultatima većine studija, gde je uočeno strukturalno oštećenje testisa pacova ali i DNK oštećenje nakon subakutne ekspozicije F⁻ kao i dozno zavisni efekat F⁻ na intenzitet repa kometa (Pal i Mukhopadhyay 2021). Zatim, hronična ekspozicija F⁻ osim što oštećuje DNK spermatozoida, ima negativan uticaj i na ekspresiju mikroRNK molekula miševa (Li i sar., 2021). Pojedini autori su istakli da F⁻ nemaju uticaj na ćelije krvi. Leite i sar. (2007) su pomoću komet testa analizirali DNK ćelija krvi i ustanovili da visoke koncentracije F⁻ ne oštećuju krv *Wistar* pacova. U drugoj studiji, autori su istakli da su vrednosti momenta repa komete i intenziteta repa komete ćelija periferne krvi kontrole i eksperimentalne grupe tretirane sa 100 ppm identične, i da F⁻ nisu toksični (Ribeiro i sar., 2004). U našoj studiji su dobijeni slični rezultati u uzorcima krvi, s obzirom da ni u jednoj doznoj grupi sa F⁻ nisu uočena značajna odstupanja u poređenju sa kontrolom.

Protektivni efekat Se na različite povišene koncentracije F⁻ pokazan je *in vivo* (Helal i El-Dakdoky 2006) i *in vitro* (Sun i sar., 2010). Suplementacija Se smanjuje toksičnost F⁻ putem različitih mehanizama: inhibicijom OS i regulacijom apoptoze kod različitih eksperimentalnih životinjskih modela (Yang i sar., 2013; Zhang i sar., 2017; Wang i sar., 2018). Natrijum-selenit u niskim dozama utiče na smanjenje DNK oštećenja i pospešuje funkcionisanje različitih reparatornih mehanizama (de Rosa i sar., 2012; Yang i sar., 2013; Kieliszek i sar., 2017). Pretpostavlja se da optimalna protektivna koncentracija natrijum-selenita kod pacova iznosi između 0,75 i 1,5 mg/l (Feng i sar., 2012; Qian i sar., 2013). Selen ispoljava antagonistička svojstva na visoke koncentracije F⁻, s obzirom da prvenstveno pozitivno deluje na antioksidativni odbrambeni sistem (Feng i sar., 2012; Yang i sar., 2013). U brojnim animalnim studijama, Se je predstavljen kao potentan zaštitni suplement, gde je uočeno da redukuje fetotoksičnost izazvanu F⁻ kao i oštećenje hepatocita (Helal i El-Dakdoky 2006; Feng i sar., 2012; Qian i sar., 2013; Al-Harbi i sar., 2014). Osim redukcije nastanka OS i apoptoze, Se protektivno deluje i na DNK oštećenja izazvana F⁻, što je pokazano na humanim hepatocitima (Wang i sar., 2004). Na osnovu podataka iz naše studije, Se je značajno smanjio DNK oštećenje u tkivu jetre izazvanog nakon ekspozicije sa 150 mg/l F⁻. Sličan rezultat dobijen je i analizom tkiva slezine, gde je suplementacija Se takođe rezultirala umanjenim DNK oštećenjem. Možemo reći da je u ovim tkivima Se jasno ispoljio svoja protektivna dejstva na DNK molekul u odnosu na izloženost visokim koncentracijama F⁻. Analizom drugih studija, uočeno je protektivno dejstvo Se i u tkivu mozga eksperimentalnih pacova, s obzirom da je Se redukovao toksičnost izazvanu F⁻ i pozitivno uticao na aktivnost antioksidativnih enzima (Narayanaswamy i sar., 2009; Basha Piler i Narayanaswamy 2011; Charitha i sar., 2018). Rezultati nekoliko istraživanja su pokazali da u hipokampusu pacova, Se poseduje sposobnost da redukuje oksidaciju lipida i proteina i direktno antagonizuje toksične efekte F⁻ (Qian i sar., 2013; Flora i Mittal 2015; Zheng i sar., 2016). Na osnovu rezultata naše studije, možemo reći da je Se uticao na DNK oštećenje neurona izazvano F⁻, ali nije uočena statistička značajnost. Slični rezultati su dobijeni i za tkivo testisa, gde je Se opet blago uticao na DNK oštećenje izazvano F⁻.

Imajući u vidu dosadašnje naučne podatke, dodatna epidemiološka i eksperimentalna istraživanja na različitim modelima, sa akutnom/subakutnom ili hroničnom ekspozicijom je potrebno sprovesti radi razjašnjavanja mehanizama potencijalne toksičnosti različitih doza F⁻ (Choubisa 2012; Ribeiro i sar., 2017). Na osnovu rezultata naše studije, sve rastuće koncentracije F⁻ su dovele do DNK oštećenja, jetre, slezine, mozga i testisa. Zanimljivo je istaći da su u tkivima jetre i mozga izuzetno velika oštećenja registrovana i u grupi sa najnižom koncentracijom F⁻ (10 mg/l). Dakle, povišene koncentracije F⁻ mogu uticati na DNK molekule različitih ćelija, i doprineti poremećaju celokupnih funkcija organizma. Posebno je važan uticaj F⁻ na reproduktivni sistem, s obzirom da se mutacije germinativnih ćelija mogu preneti na potomstvo. Na osnovu podataka iz naše studije, nijedna koncentracija F⁻ nije dovela do genotoksičnih efekata u krvi ispitivanih životinja.

Na osnovu podataka iz literature, najniža NOAEL vrednost zabeležena kod pacova koji su bili hronično izloženi F⁻ iznosi 2,5 mg/kg/dan (Guth i sar., 2020). Međutim, u našoj studiji smo pokazali da su F⁻ i pri mnogo manjim koncentracijama uticali na promene parametara redoks statusa, genotoksičnosti i koncentracije bioelemenata kod eksperimentalnih pacova. Smatramo da rezultati naše studije daju značajan doprinos budućim istraživanjima koja bi primenila *Benchmark* metodu i na humanim modelima, radi evaluacije profilaktičkih koncentracija F⁻.

6. ZAKLJUČCI

Uzimajući u obzir rezultate dobijene i prikazane u okviru ove doktorske disertacije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Sistemska subakutna ekspozicija fluoridima u koncentraciji od 50 mg/l i više, selenu i kombinaciji fluorida i selena uticala je na smanjenje unosa vode kod pacova, dok odstupanje prinosa telesne mase nije uočeno niti u jednoj eksperimentalnoj grupi;
2. Najviše koncentracije fluorida u tkivima jetre, bubrega, slezine, mozga i testisa izmerene su u grupama pacova koji su pili vodu sa 50 i 100 mg/l fluorida. Najviše koncentracije fluorida u zubima i femuru izmerene su u grupi pacova koji su pili vodu sa 150 mg/l fluorida;
3. Sistemska subakutna ekspozicija fluoridima u koncentracijama od 25 mg/l i više dovela je do patohistoloških promena u tkivima jetre i bubrega. Suplementacija selenom nije smanjila oštećenja tkiva jetre i bubrega izazvana fluoridima;
4. Sistemska subakutna ekspozicija povišenim koncentracijama fluorida dovela je do nastanka oksidativnog stresa i poremećaja parametara antioksidativne zaštite u plazmi, jetri, bubrezima, slezini, mozgu i testisima, kao i do lipidne peroksidacije u plazmi i mozgu, i oksidacije proteina u bubrezima i mozgu. Potvrđeni su dozno zavisni efekti fluorida na promene parametara redoks statusa u krvi, jetri, bubrezima, slezini, mozgu i testisima pacova;
5. Suplementacija selenom u kombinaciji sa fluoridima u plazmi i mozgu uticala je na smanjenu oksidaciju lipida, dok u bubrezima, mozgu i testisima suplementacija selenom uticala je na smanjenu oksidaciju proteina. Selen u jetri i testisima nije protektivno uticao na parametre antioksidativne zaštite, dok je u bubrezima i mozgu pokazao antioksidativni potencijal;
6. Selen je ispoljio oksidativna svojstva, s obzirom da je samostalno suplementiran u tkivima jetre i bubrega uticao na disbalans SH grupa;
7. Sistemska subakutna ekspozicija fluoridima u rastućim koncentracijama dovela je do disbalansa bakra, cinka, gvožđa i mangana u krvi, mekim i kalcifikovanim tkivima pacova. Potvrđeni su dozno zavisni efekti fluorida na promene koncentracija bakra u krvi, jetri, bubrezima, slezini i femuru; na promene koncentracija cinka u jetri, bubrezima i zubima; na promene koncentracija gvožđa u bubrezima i mozgu i na promene koncentracija mangana u jetri i bubrezima;
8. Suplementacija selenom samostalno ili u kombinaciji sa fluoridima uticala je na disbalans koncentracija bakra, cinka, gvožđa i mangana u krvi, mekim i kalcifikovanim tkivima pacova;
9. Sistemska subakutna ekspozicija fluoridima u koncentracijama od 10 mg/l i više dovela je do nastanka oštećenja DNK ćelija jetre, slezine, mozga i testisa. Potvrđeni su dozno zavisni efekti fluorida na oštećenje DNK u slezini i testisima. Suplementacija selenom značajno je smanjila oštećenja DNK u jetri i slezini.
10. Kritičan dozno zavisni štetni efekat fluorida potvrđen je u bubrezima i testisima za smanjenu aktivnost SOD1 i za povećanje nivoa oštećenja DNK u testisima, pri čemu najniži BMDL iznosi $1e-04$ mg/kg.

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da su povišene koncentracije fluorida nakon ekspozicije u trajanju od 28 dana dovele do poremećaja parametara redoks statusa, morfološkog i DNK oštećenja, kao i do disbalansa bioelemenata u tkivima *Wistar* pacova. Zatim, selen je pokazao antioksidativni efekat na pojedina oštećenja izazvana fluoridima, ali samostalno suplementiran i/ili u kombinaciji sa fluoridima uticao je na disbalans bioelemenata.

7. LITERATURA

1. Aaseth, J., Skalny, A. V., Roos, P. M., Alexander, J., Aschner, M., Tinkov, A. A. (2021). Copper, Iron, Selenium and Lipo-Glycemic Dysmetabolism in Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 22(17): 9461.
2. Abbas, M., Siddiqi, M. H., Khan, K., Zahra, K., Naqvi, A.-u.-N. (2017). Haematological evaluation of sodium fluoride toxicity in *oryctolagus cuniculus*. *Toxicol. Rep.* 4: 450-454.
3. Abdel-Gawad, F. A., Ashmawy, M. H., Zaki, S. M., Abdel-Fatah, G. H. (2014). Lung damage after long-term exposure of adult rats to sodium fluoride. *Arch. Med. Sci.* 10(5): 1035-1040.
4. Abdulle, A. E., Bourgonje, A. R., Kieneker, L. M., Koning, A. M., la Bastide-van Gemert, S., Bulthuis, M. L. C., Dijkstra, G., Faber, K. N., Dullaart, R. P. F., Bakker, S. J. L., Gans, R. O. B., Gansevoort, R. T., Mulder, D. J., Pasch, A., van Goor, H. (2020). Serum free thiols predict cardiovascular events and all-cause mortality in the general population: a prospective cohort study. *BMC Medicine.* 18(1): 130.
5. Abukurah, A. R., Moser, A. M., Jr., Baird, C. L., Randall, R. E., Jr., Setter, J. G., Blanke, R. V. (1972). Acute sodium fluoride poisoning. *Jama.* 222(7): 816-817.
6. Adedara, I. A., Ojuade, T. J. D., Olabiyi, B. F., Idris, U. F., Onibiyo, E. M., Ajeigbe, O., Farombi, E. O. (2017). Taurine Ameliorates Renal Oxidative Damage and Thyroid Dysfunction in Rats Chronically Exposed to Fluoride. *Biol. Trace Elem. Res.* 175(2): 388-395.
7. Adelakun, S. A., Akintunde, O. W., Ogunlade, B. (2021). Fluoride-induced testicular degeneration and sperm quality deteriorations: Salutory role of *Cyperus esculentus* tubers (tiger nut) extract in animal model. *Rev Int Androl.* 19(3): 201-212.
8. Adkins, E., Brunst, K. (2021). Impacts of Fluoride Neurotoxicity and Mitochondrial Dysfunction on Cognition and Mental Health: A Literature Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 18: 12884.
9. Agalakova, N. I., Gusev, G. P. (2012). Molecular mechanisms of cytotoxicity and apoptosis induced by inorganic fluoride. *Int. Sch. Res. Notices* 2012, <https://doi.org/10.5402/2012/403835>.
10. Agarwal, P., Miller, K. M. (2017). Chapter 11 - Chromatin Dynamics and DNA Repair. *Chromatin Regulation and Dynamics.* Göndör. Boston, Academic Press: 275-302. 978-0-12-803395-1.
11. Al-Harbi, M. S., Hamza, R. Z., Dwary, A. A. (2014). Ameliorative effect of selenium and curcumin on sodium fluoride induced hepatotoxicity and oxidative stress in male mice. *J. Chem. Pharm. Res.* 6: 984-998.
12. Ali, I., Al-Okaily, B., Baraa, C. (2017). Effect of sodium fluoride on liver functions of rats and amelioration by CoQ10. *J. Etnomol. Zool. Stud.* 5(5): 887-893.
13. Amaral, S. L., Azevedo, L. B. (2018). Effect of chronic exercise on fluoride metabolism in fluorosis-susceptible mice exposed to high fluoride. *Sci. Rep.* 8(1): 3211.
14. Ames, B. (2001). DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutat. Res.* 475: 7-20.
15. Angwa, L. M., Jiang, Y., Pei, J., Sun, D. (2021). Antioxidant Phytochemicals for the Prevention of Fluoride-Induced Oxidative Stress and Apoptosis: a Review. *Biol. Trace Elem. Res.* 200(3): 1418-1441.

16. Antonijević, E. (2019). Antidotska efikasnost novosintetisanih oksima K203 i K027 kod pacova akutno trovanih dihlorvosom. Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
17. Antonijevic, E., Mandinic, Z., Curcic, M., Djukic-Cosic, D., Milicevic, N., Ivanovic, M., Carevic, M. Antonijevic, B. (2016). "Borderline" fluorotic region in Serbia: correlations among fluoride in drinking water, biomarkers of exposure and dental fluorosis in schoolchildren. *Environ Geochem Health*. 38(3): 885-896.
18. Antonijevic, E., Musilek, K., Kuca, K., Djukic-Cosic, D., Andjelkovic, M., Djordjevic, A. B. Antonijevic, B. (2019). Comparison of oximes K203 and K027 based on Benchmark dose analysis of rat diaphragmal acetylcholinesterase reactivation. *Chem Biol Interact*. 308: 385-391.
19. Aoun, A., Darwiche, F., Al Hayek, S. Doumit, J. (2018). The Fluoride Debate: The Pros and Cons of Fluoridation. *Prev Nutr Food Sci*. 23(3): 171-180.
20. Arguello, J., Raimunda, D. Padilla-Benavides, T. (2013). Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 3(73).
21. Atmaca, N., Atmaca, H. T., Kanici, A. Antepioglu, T. (2014). Protective effect of resveratrol on sodium fluoride-induced oxidative stress, hepatotoxicity and neurotoxicity in rats. *Food Chem. Toxicol*. 70: 191-197.
22. ATSDR. (2003). Toxicological profile for selenium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp92.pdf>.
23. Atukorala, I. Chang, T. (2014). 69 - Musculoskeletal Disorders. *Manson's Tropical Infectious Diseases (Twenty-third Edition)*. Farrar, Hotez, Junghansset al. London, W.B. Saunders: 1027-1037. e1022.978-0-7020-5101-2.
24. Auclair, C. Voisin, E. (1988). Nitroblue tetrazolium reduction. *Handbook of methods for oxygen radicals research*, CRC Press: 123-132. 9781351072922.
25. Aulestia, F. J., Groeling, J., Bomfim, G. H. S., Costiniti, V., Manikandan, V., Chaloeemtoem, A., Concepcion, A. R., Li, Y., Wagner, L. E., 2nd, Idaghdour, Y., Yule, D. I. Lacruz, R. S. (2020). Fluoride exposure alters Ca(2+) signaling and mitochondrial function in enamel cells. *Science signaling*. 13(619).
26. Authority, E. F. S. (2009). Guidance of the Scientific Committee on Use of the benchmark dose approach in risk assessment. *EFSA Journal*. 7(6): 1150.
27. Aydin, Y. (2017). Exposure to sodium fluoride via drinking water cause cytotoxicity and oxidative damage in leydig cells. *Trakya University Journal of Natural Sciences*. 18.
28. Aziz, I. Masad, A. (2013). Fluoride-induced Hematological and Biochemical Changes in Albino Rat. The Therapeutic Action of Vitamin C and Olive Oil on Fluoride Effects. *Journal of Al Azhar University-Gaza (Natural Sciences)*. 15: 31-50.
29. Azqueta, A., Gutzkow, K. B., Priestley, C. C., Meier, S., Walker, J. S., Brunborg, G. Collins, A. R. (2013). A comparative performance test of standard, medium- and high-throughput comet assays. *Toxicol In Vitro*. 27(2): 768-773.
30. Balaha, M., Ahmed, N., Geddawy, A. Kandeel, S. (2021). Fraxetin prevented sodium fluoride-induced chronic pancreatitis in rats: Role of anti-inflammatory, antioxidant, antifibrotic and anti-apoptotic activities. *Int. Immunopharmacol*. 93: 107372.
31. Bánóczy, J., Rugg-Gunn, A. Woodward, M. (2013). Milk fluoridation for the prevention of dental caries. *Acta Med Acad*. 42(2): 156-167.
32. Baralić Katarina, J. D., Antonijević Evica, Buha-Đorđević Aelaksandra, Čurčić Marijana, Đukić-Ćosić Danijela, Bulat Zorica, Antonijević Biljana. (2020). Značaj i procena benchmark doze u toksikologiji. *Arhiv za farmaciju*. 70(3): 130-141.
33. Barbier, O., Arreola-Mendoza, L. Del Razo, L. M. (2010). Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact*. 188(2): 319-333.
34. Bartos, M., Gumilar, F., Gallegos, C. E., Bras, C., Dominguez, S., Cancela, L. M. Minetti, A. (2019). Effects of Perinatal Fluoride Exposure on Short- and Long-Term Memory, Brain

- Antioxidant Status, and Glutamate Metabolism of Young Rat Pups. *Int. J. Toxicol.* 38(5): 405-414.
35. Basha Piler, M.Narayanaswamy, M. (2011). Effect of maternal exposure of fluoride on oxidative stress markers and amelioration by selected antioxidants in developing central nervous system of rats. *Biologia.* 66: 187.
 36. Basha, P. M.Madhusudhan, N. (2010). Pre and Post Natal Exposure of Fluoride Induced Oxidative Macromolecular Alterations in Developing Central Nervous System of Rat and Amelioration by Antioxidants. *Neurochem Res.* 35(7): 1017-1028.
 37. Basu, A. K.Marnett, L. J. (1983). Unequivocal demonstration that malondialdehyde is a mutagen. *Carcinogenesis.* 4(3): 331-333.
 38. Betteridge, D. J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism.* 49(2, Supplement 1): 3-8.
 39. Bindoli, A.Rigobello, M. P. (2002). [28] - Mitochondrial Thioredoxin Reductase and Thiol Status. *Methods in Enzymology.* Sies and Packer, Academic Press. 347: 307-316.0076-6879.
 40. Birnboim, H. C. (1988). A superoxide anion induced DNA strand-break metabolic pathway in human leukocytes: effects of vanadate. *Biochem Cell Biol.* 66(5): 374-381.
 41. Błaszczuk, I., Grucka-Mamczar, E., Kasperczyk, S.Birkner, E. (2008). Influence of fluoride on rat kidney antioxidant system: effects of methionine and vitamin E. *Biol Trace Elem Res.* 121(1): 51-59.
 42. Błażewicz, A., Wiśniewska, P.Skórzyńska-Dziduszko, K. (2021). Selected Essential and Toxic Chemical Elements in Hypothyroidism—A Literature Review (2001–2021). *Int J Mol Sci.* 22(18): 10147.
 43. Bolognesi, C., Knasmueller, S., Nersesyan, A., Thomas, P.Fenech, M. (2013). The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay - an update and expanded photogallery. *Mutat Res.* 753(2): 100-113.
 44. Bombik, E., Bombik, A.Rymuza, K. (2020). The influence of environmental pollution with fluorine compounds on the level of fluoride in soil, feed and eggs of laying hens in Central Pomerania, Poland. *Environ. Monit. Assess.* 192(3): 178.
 45. Bopp, B. A., Sonders, R. C.Kesterson, J. W. (1982). Metabolic fate of selected selenium compounds in laboratory animals and man. *Drug Metab Rev.* 13(2): 271-318.
 46. Bouaziz, H., Croute, F., Boudawara, T., Soleilhavoup, J. P.Zeghal, N. (2007). Oxidative stress induced by fluoride in adult mice and their suckling pups. *Exp Toxicol Pathol.* 58(5): 339-349.
 47. Boyd, R. (2011). Selenium stories. *Nature Chemistry.* 3(7): 570-570.
 48. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
 49. Brown, D. G.Burk, R. F. (1973). Selenium retention in tissues and sperm of rats fed a Torula yeast diet. *J Nutr.* 103(1): 102-108.
 50. Brown, K. M.Arthur, J. R. (2001). Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr.* 4(2B): 593-599.
 51. Burlinson, B., Tice, R. R., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, S. Y., Collins, A. R., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, T. S., Nakajima, M., Sasaki, Y. F., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M.Hartmann, A. (2007). Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat Res.* 627(1): 31-35.
 52. Burt, B. A. (1998). Prevention policies in the light of the changed distribution of dental caries. *Acta Odontol Scand.* 56(3): 179-186.
 53. Buzalaf, M. A. R.Whitford, G. M. (2011). Fluoride metabolism. *Monogr Oral Sci.* 22: 20-36.
 54. Cao, K., Xiang, J., Dong, Y.-T., Xu, Y., Li, Y., Song, H., Zeng, X.-X., Ran, L.-Y., Hong, W.Guan, Z.-Z. (2019). Exposure to fluoride aggravates the impairment in learning and memory and neuropathological lesions in mice carrying the APP/PS1 double-transgenic mutation. *Alzheimer's Res Ther.* 11(1): 35.

55. Cao, W., Xu, J., Zhou, Z. M., Wang, G. B., Hou, F. F. Nie, J. (2013). Advanced oxidation protein products activate intrarenal renin-angiotensin system via a CD36-mediated, redox-dependent pathway. *Antioxid Redox Signal*. 18(1): 19-35.
56. Cape, J. N., Fowler, D. Davison, A. (2003). Ecological effects of sulfur dioxide, fluorides, and minor air pollutants: recent trends and research needs. *Environ Int*. 29(2-3): 201-211.
57. Carvalho, M. F. Oliveira, R. S. (2017). Natural production of fluorinated compounds and biotechnological prospects of the fluorinase enzyme. *Crit Rev Biotechnol*. 37(7): 880-897.
58. Catani, D. B., Tenuta, L., Andaló, F. Cury, J. (2010). Fluorosis in rats exposed to oscillating chronic fluoride doses. *Braz Dent J*. 21: 32-37.
59. Çetin, S. Yur, F. (2016). Levels of Trace Elements in Muscle and Kidney Tissues of Sheep with Fluorosis. *Biol Trace Elem Res*. 174(1): 82-84.
60. Chachra, D., Vieira, A. P. Grynypas, M. D. (2008). Fluoride and mineralized tissues. *Crit Rev Biomed Eng*. 36(2-3): 183-223.
61. Chan, K. K. J. O'Hagan, D. (2012). Chapter Eleven - The Rare Fluorinated Natural Products and Biotechnological Prospects for Fluorine Enzymology. *Methods in Enzymology*. Hopwood, Academic Press. 516: 219-235. 0076-6879.
62. Charitha, G., Sudhakar, K. Reddy, K. (2018). Protective Effects of Selenium Against Sodium Fluoride Induced Behavioral, Anti-Oxidant and Neurohistological Alterations in Wistar Rats. *Biosci Biotechnol Res Asia*. 15: 475-484.
63. Chatterjee, N. Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*. 58(5): 235-263.
64. Chattopadhyay, A., Podder, S., Agarwal, S. Bhattacharya, S. (2011). Fluoride-induced histopathology and synthesis of stress protein in liver and kidney of mice. *Arch Toxicol*. 85(4): 327-335.
65. Chen, J. J., Cao, J. L., Luo, Y. J. Li, J. Y. (2013). Effects of nano-selenium on antioxidant capacity and histopathology of *Cyprinus carpio* liver under fluoride stress. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*. 24(10): 2970-2976.
66. Chen, S., Xue, Y., Shen, Y., Ju, H., Zhang, X., Liu, J. Wang, Y. (2022). Effects of different selenium sources on duodenum and jejunum tight junction network and growth performance of broilers in a model of fluorine-induced chronic oxidative stress. *Poult Sci*. 101(3): 101664.
67. Chen, T., Cui, H., Cui, Y., Bai, C. Gong, T. (2011). Decreased antioxidant activities and oxidative stress in the spleen of chickens fed on high-fluorine diets. *Hum Exp Toxicol*. 30(9): 1282-1286.
68. Chioca, L. R., Raupp, I. M., Da Cunha, C., Losso, E. M. Andreatini, R. (2008). Subchronic fluoride intake induces impairment in habituation and active avoidance tasks in rats. *European J Pharmacol*. 579(1): 196-201.
69. Chmielnicka, J., Bem, E. M., Brzeźnicka, E. A. Kasperek, M. (1985). The tissue disposition of zinc and copper following repeated administration of cadmium and selenium to rats. *Environ Res*. 37(2): 419-424.
70. Choubisa, S. (2012). Status of Fluorosis in Animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biol Sci*. 82.
71. Chouhan, S., Kushwaha, P., Kaul, R. Flora, S. J. S. (2013). Co-administration of selenium but not iron prevents fluoride toxicity in rats. *Biomed Prev Nutr*. 3(2): 113-120.
72. Chung, J. Y., Kim, H. S. Song, J. (2018). Iron metabolism in diabetes-induced Alzheimer's disease: a focus on insulin resistance in the brain. *Biometals*. 31(5): 705-714.
73. Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*. 26(3): 249-261.
74. Collins, A. R. Dusinská, M. (2002). Oxidation of cellular DNA measured with the comet assay. *Methods Mol Biol*. 186: 147-159.

75. Collins, T. F., Sprando, R. L., Shackelford, M. E., Black, T. N., Ames, M. J., Welsh, J. J., Balmer, M. F., Olejnik, N., Ruggles, D. I. (1995). Developmental toxicity of sodium fluoride in rats. *Food Chem Toxicol.* 33(11): 951-960.
76. Crespo, A. M., Neve, J., Pinto, R. E. (1993). Plasma and liver selenium levels in the rat during supplementation with 0.5, 2, 6, and 15 ppm selenium in drinking water. *Biol Trace Elem Res.* 38(2): 139-147.
77. Cross, A. R., Segal, A. W. (2004). The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta.* 1657(1): 1-22.
78. Crump, K. S. (1995). Calculation of benchmark doses from continuous data. *Risk Analysis.* 15(1): 79-89.
79. Crump, K. S. (1984). A new method for determining allowable daily intakes. *Fundam Appl Toxicol.* 4(5): 854-871.
80. Das, S. S., Maiti, R., Ghosh, D. (2006). Fluoride-induced immunotoxicity in adult male albino rat: a correlative approach to oxidative stress. *J Immunotoxicol.* 3(2): 49-55.
81. Daston, G. P., Rehnberg, B. F., Carver, B., Kavlock, R. J. (1985). Toxicity of sodium fluoride to the postnatally developing rat kidney. *Environ Res.* 37(2): 461-474.
82. de Carvalho, J. G., de Oliveira, R. C., Buzalaf, M. A. R. (2006). Plasma as an indicator of bone fluoride levels in rats chronically exposed to fluoride. *J App Oral sci : revista FOB.* 14(4): 238-241.
83. de Rosa, V., Erkekoglu, P., Forestier, A., Favier, A., Hincal, F., Diamond, A. M., Douki, T., Rachidi, W. (2012). Low doses of selenium specifically stimulate the repair of oxidative DNA damage in LNCaP prostate cancer cells. *Free Radic Res.* 46(2): 105-116.
84. Dean, H. T. (1934). Classification of Mottled Enamel Diagnosis. *J Am Dent Assoc.* 21(8): 1421-1426.
85. Dec, K., Łukomska, A., Baranowska-Bosiacka, I., Pilutin, A., Maciejewska, D., Skonieczna-Żydecka, K., Derkacz, R., Goschorska, M., Wąsik, A., Rębacz-Maron, E., Gutowska, I. (2018). Pre- and postnatal exposition to fluorides induce changes in rats liver morphology by impairment of antioxidant defense mechanisms and COX induction. *Chemosphere.* 211: 112-119.
86. Dec, K., Łukomska, A., Skonieczna-Żydecka, K., Jakubczyk, K., Tarnowski, M., Lubkowska, A., Baranowska-Bosiacka, I., Styburski, D., Skórka-Majewicz, M., Maciejewska, D., Gutowska, I. (2020). Chronic Exposure to Fluoride Affects GSH Level and NOX4 Expression in Rat Model of This Element of Neurotoxicity. *Biomolecules.* 10(3): 422.
87. Dehnen, S., Schafer, L. L., Lectka, T., Togni, A. (2021). Fluorine: A Very Special Element and Its Very Special Impacts on Chemistry. *Org Lett.* 23(23): 9013-9019.
88. DenBesten, P., Li, W. (2011). Chronic fluoride toxicity: dental fluorosis. *Monogr Oral Sci.* 22: 81-96.
89. Dhurvey, V., Patil, V., Thakare, M. (2017). Effect of sodium fluoride on the structure and function of the thyroid and ovary in albino rats (*Rattus norvegicus*). *Fluoride.* 50: 235-246.
90. Dionizio, A., Uyghurturk, D. A., Melo, C. G. S., Sabino-Arias, I. T., Araujo, T. T., Ventura, T. M. S., Perles, J. V. C. M., Zaroni, J. N., Den Besten, P., Buzalaf, M. A. R. (2021). Intestinal changes associated with fluoride exposure in rats: Integrative morphological, proteomic and microbiome analyses. *Chemosphere.* 273: 129607.
91. Dlugosz, A., Roszkowska, A., Zimmer, M. (2009). Oestradiol protects against the harmful effects of fluoride more by increasing thiol group levels than scavenging hydroxyl radicals. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 105(6): 366-373.
92. Dobutovic, B., Sudar, E., Tepavcevic, S., Djordjevic, J., Djordjevic, A., Radojicic, M., Isenovic, E. R. (2014). Effects of ghrelin on protein expression of antioxidative enzymes and iNOS in the rat liver. *Arch Med Sci.* 10(4): 806-816.
93. Dogan, M. (2018). Relation of Trace Elements on Dental Health. *Trace Elements.* 978-1-78923-670-5.

94. Drljačić, A. P. (2013). Influence of different quantities of organic selenium on performances and meat quality of broilers. Faculty of Veterinary Medicine. Belgrade, University of Belgrade.
95. Dubois-Deruy, E., Peugnet, V., Turkieh, A., Pinet, F. (2020). Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants*. 9(9).
96. EFSA (2013). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fluoride. 11, DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3332.
97. EFSA (2014). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for selenium. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3846>.
98. EFSA. (2017). Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment. *EFSA Journal*. 15(1): e04658.
99. EFSA (2011). Use of BMDS and PROAST software packages by EFSA Scientific Panels and Units for applying the Benchmark Dose (BMD) approach in risk assessment. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2011.EN-113>.
100. EFSA (2017). Workshop confirms BMD approach as the best method for dose-response modelling in risk assessment. <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/event/170301-0/170301-0-p2.pdf>.
101. El-Iethy, H. S., Kamel, M. M., Shaheed, B. (2010). Neurobehavioral toxicity produced by sodium fluoride in drinking water of laboratory rats. *J Am Sci*. 6: 54-63.
102. El-Megharbel, S. M., Al-Salmi, F. A., Refat, M. S., Hamza, R. Z. (2021). Selenium/Chitosan-Folic Acid Metal Complex Ameliorates Hepatic Damage and Oxidative Injury in Male Rats Exposed to Sodium Fluoride. *Crystals*. 11(11): 1354.
103. Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 82(1): 70-77.
104. Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 38(12): 1103-1111.
105. Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*. 37(4): 277-285.
106. Ersan, Y., Koç, E., Ari, İ., Karademir, B. (2010). Histopathological effects of chronic fluorosis on the liver of mice (Swiss albino). *Turk J Med Sci*. 40.
107. Everett, E. T. (2011). Fluoride's effects on the formation of teeth and bones, and the influence of genetics. *J Dent Res*. 90(5): 552-560.
108. Feltrin-Souza, J., Costa, S. A. d., Bussaneli, D. G., Santos-Pinto, L., Cerri, P. S., Cury, J., Tenuta, L., Cordeiro, R. d. C. L. (2021). In vivo effect of fluoride combined with amoxicillin on enamel development in rats. *J Appl Oral Sci*. 29: e20210171-e20210171.
109. Feng, P., Wei, J., R. Zhang, Z. G. (2012). Influence of selenium and fluoride on blood antioxidant capacity of rats. *Exp Toxicol Pathol*. 64(6): 565-568.
110. Feoli, A. M. P., Macagnan, F. E., Piovesan, C. H., Bodanese, L. C., Siqueira, I. R. (2014). Xanthine Oxidase Activity Is Associated with Risk Factors for Cardiovascular Disease and Inflammatory and Oxidative Status Markers in Metabolic Syndrome: Effects of a Single Exercise Session. *Oxid Med Cell Longev*. 2014: 587083.
111. Ferreira, M. K. M., Aragão, W. A. B., Bittencourt, L. O., Puty, B., Dionizio, A., Souza, M. P. C., Buzalaf, M. A. R., de Oliveira, E. H., Crespo-Lopez, M. E., Lima, R. R. (2021). Fluoride exposure during pregnancy and lactation triggers oxidative stress and molecular changes in hippocampus of offspring rats. *Ecotoxicol Environ Saf*. 208: 111437.
112. Figueroa-González, G., Pérez-Plasencia, C. (2017). Strategies for the evaluation of DNA damage and repair mechanisms in cancer. *Oncol Lett*. 13(6): 3982-3988.
113. Fischer, J. L., Lancia, J. K., Mathur, A., Smith, M. L. (2006). Selenium protection from DNA damage involves a Ref1/p53/Brcal protein complex. *Anticancer Res*. 26(2A): 899-904.
114. Flora, S. J., Mittal, M. (2015). Preventing Fluoride Toxicity with Selenium. *Fluorine: Chemistry, Analysis, Function and Effects*. 978-1-84973-888-0.

115. Forman, H. J. Zhang, H. (2021). Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 20(9): 689-709.
116. Forrester, S. J., Kikuchi, D. S., Hernandez, M. S., Xu, Q. Griendling, K. K. (2018). Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res.* 122(6): 877-902.
117. Forte, G., Bocca, B., Pisano, A., Collu, C., Farace, C., Sabalic, A., Senofonte, M., Fois, A. G., Mazzarello, V. L., Pirina, P. Madeddu, R. (2021). The levels of trace elements in sputum as biomarkers for idiopathic pulmonary fibrosis. *Chemosphere.* 271: 129514.
118. Foureau, D. M., Walling, T. L., Maddukuri, V., Anderson, W., Culbreath, K., Kleiner, D. E., Ahrens, W. A., Jacobs, C., Watkins, P. B., Fontana, R. J., Chalasani, N., Talwalkar, J., Lee, W. M., Stolz, A., Serrano, J. Bonkovsky, H. L. (2015). Comparative analysis of portal hepatic infiltrating leucocytes in acute drug-induced liver injury, idiopathic autoimmune and viral hepatitis. *Clin Exp Immunol.* 180(1): 40-51.
119. Fremont, R. D. Rice, T. W. (2007). Splenosis: a review. *Southern medical journal.* 100(6): 589-594.
120. Fukada, T., Yamasaki, S., Nishida, K., Murakami, M. Hirano, T. (2011). Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. *J Biol Inor Chem.* 16(7): 1123-1134.
121. Gao, J., Tian, X., Yan, X., Wang, Y., Wei, J., Wang, X., Yan, X. Song, G. (2021). Selenium Exerts Protective Effects Against Fluoride-Induced Apoptosis and Oxidative Stress and Altered the Expression of Bcl-2/Caspase Family. *Biol Trace Elem Res.* 199(2): 682-692.
122. Gao, J., Wang, Y., Xu, G., Wei, J., Chang, K., Tian, X., Liu, M., Yan, X., Huo, M. Song, G. (2019). Selenium attenuates apoptosis and p-AMPK expressions in fluoride-induced NRK-52E cells. *Environ Sci Pollut Res Int.* 26(15): 15685-15697.
123. García-Montalvo, E. A., Reyes-Pérez, H. Del Razo, L. M. (2009). Fluoride exposure impairs glucose tolerance via decreased insulin expression and oxidative stress. *Toxicology.* 263(2-3): 75-83.
124. Gessner, B. D., Beller, M., Middaugh, J. P. Whitford, G. M. (1994). Acute fluoride poisoning from a public water system. *N Engl J Med.* 330(2): 95-99.
125. Gillis, E., Eastman, K., Hill, M. Donnelly, D. (2015). Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. *J Med Chem.* 58(21): 8315-8359.
126. Girotti, M. J., Khan, N. McLellan, B. A. (1991). Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma.* 31(1): 32-35.
127. Grandjean, P. (2019). Developmental fluoride neurotoxicity: an updated review. *Environ Health.* 18(1): 110-110.
128. Grandjean, P. Landrigan, P. J. (2014). Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol.* 13(3): 330-338.
129. Gryszczyńska, B., Formanowicz, D., Budzyń, M., Wanic-Kossowska, M., Pawliczak, E., Formanowicz, P., Majewski, W., Strzyżewski, K. W., Kasprzak, M. P. Iskra, M. (2017). Advanced Oxidation Protein Products and Carbonylated Proteins as Biomarkers of Oxidative Stress in Selected Atherosclerosis-Mediated Diseases. *BioMed Res Intern.* 2017: 4975264.
130. Guo, H., Kuang, P., Luo, Q., Cui, H., Deng, H., Liu, H., Lu, Y., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X. Zhao, L. (2017). Effects of sodium fluoride on blood cellular and humoral immunity in mice. *Oncotarget.* 8(49): 85504-85515.
131. Guo, Q., Sun, Z., Niu, R., Manthari, R. K., Yuan, M., Yang, K., Cheng, M., Gong, Z. Wang, J. (2020). Effect of arsenic and/or fluoride gestational exposure on renal autophagy in offspring mice. *Chemosphere.* 241: 124861.
132. Gupta, P., Gupta, N., Meena, K., Moon, N. J., Kumar, P. Kaur, R. (2015). Concentration of Fluoride in Cow's and Buffalo's Milk in Relation to Varying Levels of Fluoride Concentration in Drinking Water of Mathura City in India- A Pilot Study. *J Clin Diagn Res.* 9(5): LC05-LC07.
133. Guth, S., Hüser, S., Roth, A., Degen, G., Diel, P., Edlund, K., Eisenbrand, G., Engel, K. H., Epe, B., Grune, T., Heinz, V., Henle, T., Humpf, H. U., Jäger, H., Joost, H. G., Kulling, S. E.,

- Lampen, A., Mally, A., Marchan, R., Marko, D., Mühle, E., Nitsche, M. A., Röhrdanz, E., Stadler, R., van Thriel, C., Vieths, S., Vogel, R. F., Wascher, E., Watzl, C., Nöthlings, U.Hengstler, J. G. (2021). Contribution to the ongoing discussion on fluoride toxicity. *Arch Toxicol.* 95(7): 2571-2587.
134. Guth, S., Hüser, S., Roth, A., Degen, G., Diel, P., Edlund, K., Eisenbrand, G., Engel, K. H., Epe, B., Grune, T., Heinz, V., Henle, T., Humpf, H. U., Jäger, H., Joost, H. G., Kulling, S. E., Lampen, A., Mally, A., Marchan, R., Marko, D., Mühle, E., Nitsche, M. A., Röhrdanz, E., Stadler, R., van Thriel, C., Vieths, S., Vogel, R. F., Wascher, E., Watzl, C., Nöthlings, U.Hengstler, J. G. (2020). Toxicity of fluoride: critical evaluation of evidence for human developmental neurotoxicity in epidemiological studies, animal experiments and in vitro analyses. *Arch Toxicol.* 94(5): 1375-1415.
135. Gutiérrez-Salinas, J. (2006). What do you know about free radicals. *Rev. Mex. Cien. Farm.* 37: 69-73.
136. Gutiérrez-Salinas, J., García-Ortíz, L., Morales González, J. A., Hernández-Rodríguez, S., Ramírez-García, S., Núñez-Ramos, N. R.Madrigal-Santillán, E. (2013). In Vitro Effect of Sodium Fluoride on Malondialdehyde Concentration and on Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase in Human Erythrocytes. *Sci World J.* 2013: 864718.
137. Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet.* 344(8924): 721-724.
138. Halliwell, B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology.* 141(2): 312-322.
139. Halliwell, B.Gutteridge, J. M. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys.* 246(2): 501-514.
140. Han, J., Kiss, L., Mei, H., Remete, A. M., Ponikvar-Svet, M., Sedgwick, D. M., Roman, R., Fustero, S., Moriwaki, H.Soloshonok, V. A. (2021). Chemical Aspects of Human and Environmental Overload with Fluorine. *Chem Rev.* 121(8): 4678-4742.
141. Hardy, A., Benford, D., Halldorsson, T., Jeger, M. J., Knutsen, K. H., More, S., Mortensen, A., Naegeli, H., Noteborn, H., Ockleford, C., Ricci, A., Rychen, G., Silano, V., Solecki, R., Turck, D., Aerts, M., Bodin, L., Davis, A., Edler, L., Gundert-Remy, U., Sand, S., Slob, W., Bottex, B., Abrahantes, J. C., Marques, D. C., Kass, G.Schlatter, J. R. (2017). Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment. *EFSA.* 15(1): e04658.
142. Hayyan, M., Hashim, M. A.AINashef, I. M. (2016). Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chem Rev.* 116(5): 3029-3085.
143. He, L. F.Chen, J. G. (2006). DNA damage, apoptosis and cell cycle changes induced by fluoride in rat oral mucosal cells and hepatocytes. *World J Gastroenterol.* 12(7): 1144-1148.
144. Heard, K., Hill, R. E., Cairns, C. B.Dart, R. C. (2001). Calcium neutralizes fluoride bioavailability in a lethal model of fluoride poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol.* 39(4): 349-353.
145. Helal, M.El-Dakdoky, M. (2006). Fetotoxicity of fluoride in rats and the protective action of some antioxidants. *Fluoride.* 39: 202-210.
146. Igl, B. W. (2018). Statistical Analysis of the Comet-Assay. PSI Toxicology SIG Webinar. https://www.psiweb.org/docs/default-source/default-document-library/psi_toxsig_webinar_comet_berndigl.pdf?sfvrsn=64a8dedb_0.
147. Illam, S. P., Kandiyil, S. P.Narayanankutty, A. (2021). Virgin coconut oil complements with its polyphenol components mitigate sodium fluoride toxicity in vitro and in vivo. *Drug Chem Toxicol.* (18): 1-7.
148. Inkielewicz-Stepniak, I.Czarnowski, W. (2010). Oxidative stress parameters in rats exposed to fluoride and caffeine. *Food Chem Toxicol.* 48(6): 1607-1611.
149. Inkielewicz-Stepniak, I.Knap, N. (2012). Effect of exposure to fluoride and acetaminophen on oxidative/nitrosative status of liver and kidney in male and female rats. *Pharmacol Rep.* 64(4): 902-911.

150. Irato, P.Santovito, G. (2021). Enzymatic and Non-Enzymatic Molecules with Antioxidant Function. *Antioxidants*. 10(4): 579.
151. Izquierdo-Vega, J. A., Sánchez-Gutiérrez, M.Del Razo, L. M. (2008). Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss. *Toxicol Appl Pharmacol*. 230(3): 352-357.
152. J, M., Sinha, S., Ghosh, M.Mukherjee, A. (2013). Evaluation of multi-endpoint assay to detect genotoxicity and oxidative stress in mice exposed to sodium fluoride. *Mutat Res*. 751(1): 59-65.
153. Jacobson, K. A. (1996). Fluorine-containing Amino Acids. *J Med Chem*. 39(20): 4132-4132.
154. Jarrar, B. M.Taib, N. T. (2012). Histological and histochemical alterations in the liver induced by lead chronic toxicity. *Saudi J Biol Sci*. 19(2): 203-210.
155. Jáudenes Marrero, J., Paz, S., Rubio, C.Gutiérrez, A. (2020). Fluoride Risk Assessment from Consumption of Different Foods Commercialized in a European Region. *App Sci*. 10: 6582.
156. Javorac, D., Antonijević, B., Anđelković, M., Repić, A., Bulat, P., Djordjevic, A. B., Baralić, K., Đukić-Čosić, D., Antonić, T.Bulat, Z. (2021). Oxidative stress, metallomics and blood toxicity after subacute low-level lead exposure in Wistar rats: Benchmark dose analyses. *Environ Pollut*. 291: 118103.
157. Jensen, S. M., Kluxen, F. M.Ritz, C. (2019). A Review of Recent Advances in Benchmark Dose Methodology. *Risk Analysis*. 39(10): 2295-2315.
158. Jinadasa, K. B.Dissanayake, C. B. (1992). The effect of selenium on fluoride - clay interactions: Possible environmental health implications. *Environ Geochem Health*. 14(1): 3-7.
159. Johnson, F.Giulivi, C. (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Asp Med*. 26(4): 340-352.
160. Ju, H., Chen, S., Xue, Y., Zhang, X.Wang, Y. (2021). The role of Nrf2 pathway in alleviating fluorine-induced apoptosis by different selenium sources in the chicken duodenum and jejunum. *Ecotoxicol Environ Safety*. 224: 112708.
161. Kanbur, M., Eraslan, G., Silici, S.Karabacak, M. (2009). Effects of sodium fluoride exposure on some biochemical parameters in mice: Evaluation of the ameliorative effect of royal jelly applications on these parameters. *Food Chem Toxicol*. 47(6): 1184-1189.
162. Kanduti, D., Sterbenk, P.Artnik, B. (2016). Fluoride: a review of use and effects on health. *Mater Sociomed*. 28(2): 133-137.
163. Kanwar, K. C.Singh, M. (1981). Zinc Depletion following experimental fluorosis in mice. *Sci Total Environ*. 22(1): 79-83.
164. Kanwar, K. C.Singh, M. (1981). Zinc, copper and manganese levels in various tissues following fluoride administration. *Experientia*. 37(12): 1328-1329.
165. Kao, W. F., Deng, J. F., Chiang, S. C., Heard, K., Yen, D. H., Lu, M. C., Kuo, B. I., Kuo, C. C., Liu, T. Y.Lee, C. H. (2004). A simple, safe, and efficient way to treat severe fluoride poisoning--oral calcium or magnesium. *J Toxicol Clin Toxicol*. 42(1): 33-40.
166. Karademir, B. (2010). Effect of fluoride ingestion on serum levels of the trace minerals Co, Mo, Cr, Mn and Li in adult male mice. *Fluoride*. 43: 174-178.
167. Karthikeyan, B.Lakshmanan, E. (2011). Fluoride in Groundwater: Causes, Implications and Mitigation Measures. *Fluoride Properties, Applications and Environmental Management, Nova*: 111-136.978-1-61209-393-2.
168. Karunasinghe, N.Ferguson, L. R. (2017). Chapter 39 - Could Selenium Be a Double-Edged Sword? *Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals*. Collins. Boston, Academic Press: 475-486.978-0-12-802168-2.
169. Kashyap, S. J., Sankannavar, R.Madhu, G. M. (2021). Fluoride sources, toxicity and fluorosis management techniques – A brief review. *J Hazard Mat Lett*. 2: 100033.
170. Katz, N.Rader, D. J. (2019). Manganese homeostasis: from rare single-gene disorders to complex phenotypes and diseases. *J Clin Investig*. 129(12): 5082-5085.

171. Khandare, A. L., Validandi, V., Boiroju, N. (2018). Fluoride Alters Serum Elemental (Calcium, Magnesium, Copper, and Zinc) Homeostasis Along with Erythrocyte Carbonic Anhydrase Activity in Fluorosis Endemic Villages and Restores on Supply of Safe Drinking Water in School-Going Children of Nalgonda District, India. *Biol Trace Elem Res.* 185(2): 289-294.
172. Kheradpisheh, Z., Mirzaei, M., Mahvi, A. H., Mokhtari, M., Azizi, R., Fallahzadeh, H., Ehrampoush, M. H. (2018). Impact of Drinking Water Fluoride on Human Thyroid Hormones: A Case- Control Study. *Sci Rep.* 8(1): 2674.
173. Kieliszek, M., Lipinski, B., Blazejak, S. (2017). Application of Sodium Selenite in the Prevention and Treatment of Cancers. *Cells.* 6(4).
174. Kim, S. J., Choi, M. C., Park, J. M., Chung, A. S. (2021). Antitumor Effects of Selenium. *Int J Mol Sci.* 22(21): 11844.
175. Kirby, E. D., Muroy, S. E., Sun, W. G., Covarrubias, D., Leong, M. J., Barchas, L. A., Kaufer, D. (2013). Acute stress enhances adult rat hippocampal neurogenesis and activation of newborn neurons via secreted astrocytic FGF2. *Elife.* 2: e00362.
176. Kirit, A., Yesilnacar, M., Çalışır, M., Bayhan, İ., Çelik, H. (2020). Oxidative stress, DNA damage and apoptosis levels in those who use borderline high level fluoride content drinking water. *J Contemp Med.* 10: 45-50.
177. Knodell, R. G., Ishak, K. G., Black, W. C., Chen, T. S., Craig, R., Kaplowitz, N., Kiernan, T., Wollman, J. (1981). Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology.* 1(5): 431-435.
178. Kolarević, S., Aborgiba, M., Kračun-Kolarević, M., Kostić, J., Simonović, P., Simić, V., Milošković, A., Reischer, G., Farnleitner, A., Gačić, Z., Milačić, R., Zuliani, T., Vidmar, J., Pergal, M., Piria, M., Paunović, M., Vuković-Gačić, B. (2016). Evaluation of Genotoxic Pressure along the Sava River. *PLoS One.* 11(9).
179. Kolarević, S. M. (2014). Primena komet testa na slatkovodnim školjkama *Unio pictorum* (LINNAEUS, 1758), *Unio tumidus* (PHILIPSSON, 1788) i *Sinanodonta woodiana* (LEA, 1834) u ekogenotoksikološkoj proceni akvatičnih ekosistema. *Biološki fakultet. Beograd, Univerzitet u Beogradu. Doktorska disertacija.*
180. Kong, W., Liu, F., Zhang, C., Zhang, J., Feng, H. (2016). Non-destructive determination of Malondialdehyde (MDA) distribution in oilseed rape leaves by laboratory scale NIR hyperspectral imaging. *Sci Rep.* 6: 35393.
181. Kostić, J., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Aborgiba, M., Gačić, Z., Lenhardt, M., Vuković-Gačić, B. (2016). Genotoxicity assessment of the Danube River using tissues of freshwater bream (*Abramis brama*). *Environ Sci Pollut Res Int.* 23(20): 20783-20795.
182. Kotur-Stevuljevic, J., Spasic, S., Jelic-Ivanovic, Z., Spasojevic-Kalimanovska, V., Stefanovic, A., Vujovic, A., Memon, L., Kalimanovska-Ostic, D. (2008). PON1 status is influenced by oxidative stress and inflammation in coronary heart disease patients. *Clin Biochem.* 41(13): 1067-1073.
183. Krasowska, A., Włostowski, T. (1992). The effect of high fluoride intake on tissue trace elements and histology of testicular tubules in the rat. *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol Toxicol.* 103(1): 31-34.
184. Krishnamoorthy, P., Gowda, N., Vallesha, N., Rajendran, D., Maya, G., Verma, S., Rahman, H. (2015). Effect of subchronic fluoride exposure on immune status and histopathology in rats and its amelioration. *Fluoride.* 48(2): 123-130.
185. Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehtab, O., Guigó, R., Gladyshev, V. N. (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science.* 300(5624): 1439-1443.
186. Kuang, P., Deng, H., Cui, H., Chen, L., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Wang, X., Zhao, L. (2016). Sodium fluoride (NaF) causes toxic effects on splenic development in mice. *Oncotarget.* 8.

187. Kuang, P., Deng, H., Cui, H., Chen, L., Guo, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Wang, X., Zhao, L. (2016). Suppressive effects of sodium fluoride on cultured splenic lymphocyte proliferation in mice. *Oncotarget*. 7(38): 61905-61915.
188. Kumar, A., Kumari, S. (2013). Histopathology of spleen of rat (*Ratus norvegicus*) fed on doses of sodium fluoride. *Indian J Sci Res*. 4(1): 87-92.
189. Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P., Jha, A. N. (2009). Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol*. 25(1): 53-64.
190. Labib, H., Badr, A. M., Abdelgwad, M., Abd El-Galil, T. I. (2021). KEAP1/Nrf2 pathway in sodium fluoride-induced cardiac toxicity and the prophylactic role of vitamin C versus platelet-rich plasma. *Folia Morphol (Warsz)*.
191. Lacson, C. F. Z., Lu, M.-C., Huang, Y.-H. (2020). Fluoride network and circular economy as potential model for sustainable development-A review. *Chemosphere*. 239: 124662.
192. Langie, S., Azqueta, A., Collins, A. (2015). The comet assay: past, present, and future. *Front Genet*. 6(266).
193. Lee, K. H., Jeong, D. (2012). Bimodal actions of selenium essential for antioxidant and toxic pro-oxidant activities: the selenium paradox (Review). *Mol Med Rep*. 5(2): 299-304.
194. Leite, A., Santiago-Jr, J., Levy, F., Gutierrez Maria, A., Fernandes, M., Salvadori, D., Ribeiro, D., Buzalaf, M. (2007). Absence of DNA damage in multiple organs (blood, liver, kidney, thyroid gland and urinary bladder) after acute fluoride exposure in rats. *Hum Exp Toxicol*. 26: 435-440.
195. Letavayová, L., Vlcková, V., Brozmanová, J. (2006). Selenium: from cancer prevention to DNA damage. *Toxicology*. 227(1-2): 1-14.
196. Levine, M. (2011). *Topics in dental biochemistry*. Springer, <http://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=667003>.
197. Li, H., Hao, Z., Wang, L., Yang, J., Zhao, Y., Cheng, X., Yuan, H., Wang, J. (2021). Dietary Calcium Alleviates Fluorine-Induced Liver Injury in Rats by Mitochondrial Apoptosis Pathway. *Biol Trace Elem Res*. 200(1): 271-280.
198. Li, L. (2003). The biochemistry and physiology of metallic fluoride: action, mechanism, and implications. *Crit Rev Oral Biol & Med*. 14(2): 100-114.
199. Li, Y., Gong, H., Li, S., Zhang, Y. (2020). Ecological Stoichiometry Homeostasis of Six Microelements in *Leymus chinensis* Growing in Soda Saline-Alkali Soil. *Sustainability*. 12: 4226.
200. Li, Y., Min, c., Zhao, Y., Wang, J., Wang, J. (2021). Effects of fluoride on PIWI-interacting RNA expression profiling in testis of mice. *Chemosphere*. 269: 128727.
201. Liang, C., Gao, Y., Zhao, Y., Kumar, R., Ma, J., Niu, R., Wang, J., Jianhai, Z., Wang, J. (2018). Effects of Fluoride and/or Sulfur Dioxide on Morphology and DNA Integrity in Rats' Hepatic Tissue. *Biol Trace Elem Res*. 183(2): 335-341.
202. Lima, L. A. d. O., Miranda, G. H. N., Aragão, W. A. B., Bittencourt, L. O., dos Santos, S. M., de Souza, M. P. C., Nogueira, L. S., de Oliveira, E. H. C., Monteiro, M. C., Dionizio, A., Leite, A. L., Pessan, J. P., Buzalaf, M. A. R., Lima, R. R. (2021). Effects of Fluoride on Submandibular Glands of Mice: Changes in Oxidative Biochemistry, Proteomic Profile, and Genotoxicity. *Front Pharmacol*. 27(12): 715394
203. Lindahl, C. B., Mahmood, T. (2009). Fluorine Compounds, Inorganic, Introduction. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*: 1-8
204. Liu, G., Ye, Q., Chen, W., Zhao, Z., Li, L., Lin, P. (2015). Study of the relationship between the lifestyle of residents residing in fluorosis endemic areas and adult skeletal fluorosis. *Environ Toxicol Pharmacol*. 40(1): 326-332.
205. Liu, J., Wang, H. W., Zhao, W. P., Li, X. T., Lin, L., Zhou, B. H. (2019). Induction of pathological changes and impaired expression of cytokines in developing female rat spleen after chronic excess fluoride exposure. *Toxicol Ind Health*. 35(1): 43-52.

206. Liu, Z., Goodwin, M., Ellwood, R. P., Pretty, I. A., McGrady, M. (2018). Automatic detection and classification of dental fluorosis in vivo using white light and fluorescence imaging. *J Dent.* 74: S34-S41.
207. Lu, J., Holmgren, A. (2009). Selenoproteins. *J Biol Chem.* 284(2): 723-727.
208. Lu, Y., Luo, Q., Cui, H., Deng, H., Kuang, P., Liu, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., Zhao, L. (2017). Sodium fluoride causes oxidative stress and apoptosis in the mouse liver. *Aging (Albany NY).* 9(6): 1623-1639.
209. Lu, Y., Luo, Q., Cui, H., Deng, H., Kuang, P., Liu, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., Zhao, L. (2017). Sodium fluoride causes oxidative stress and apoptosis in the mouse liver. *Aging.* 9(6): 1623-1639.
210. Luo, Q., Cui, H., Deng, H., Kuang, P., Liu, H., Lu, Y., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., Zhao, L. (2017). Histopathological findings of renal tissue induced by oxidative stress due to different concentrations of fluoride. *Oncotarget.* 8(31): 50430-50446.
211. Lynch, R. J., Duckworth, R. M. (2020). Chapter 4: Microelements: Part I: Zn, Sn, Cu, Fe and I. *Monogr Oral Sci.* 28: 32-47.
212. Ma, H., Wu, X., Yang, M., Wang, J., Wang, J., Wang, J. (2014). Effects of fluoride on bacterial growth and its gene/protein expression. *Chemosphere.* 100: 190-193.
213. Ma, Y., Ma, Z., Yin, S., Yan, X., Wang, J. (2017). Arsenic and fluoride induce apoptosis, inflammation and oxidative stress in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Chemosphere.* 167: 454-461.
214. Mabelya, L., van 't Hof, M. A., Konig, K. G., van Palenstein Helder, W. H. (1994). Comparison of two indices of dental fluorosis in low, moderate and high fluorosis Tanzanian populations. *Community Dent Oral Epidemiol.* 22(6): 415-420.
215. Madamanchi, N. R., Vendrov, A., Runge, M. S. (2005). Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25(1): 29-38.
216. Mahaboob Basha, P., Madhusudhan, N. (2011). Effect of maternal exposure of fluoride on oxidative stress markers and amelioration by selected antioxidants in developing central nervous system of rats. *Biologia.* 66(1): 187-193.
217. Mahajan, L., Verma, P. K., Raina, R., Pankaj, N. K., Sood, S., Singh, M. (2018). Alteration in thiols homeostasis, protein and lipid peroxidation in renal tissue following subacute oral exposure of imidacloprid and arsenic in Wistar rats. *Toxicol Rep.* 5: 1114-1119.
218. Mahesh, J., Veeresh, D. J., Akhil, P., Vishnuprasad, S., Premkumar, S., Shaswata, K. (2020). Comparative Evaluation of Root Caries Remineralization Effect of Plain Milk, 5 ppm of Fluoridated Milk, and 5 ppm of Sodium Fluoride in Deionized Water Using Surface Microhardness Test: An In Vitro Study. *J Pharm Bioallied Sci.* 12(Suppl 1): S182-S189.
219. Maheshwari, N., Qasim, N., Anjum, R., Mahmood, R. (2021). Fluoride enhances generation of reactive oxygen and nitrogen species, oxidizes hemoglobin, lowers antioxidant power and inhibits transmembrane electron transport in isolated human red blood cells. *Ecotoxicol Environ Safety.* 208: 111611.
220. Maity, P. P., Dash, M., Dey, A., Maity, M., Chattopadhyay, S. (2021). Vitamin C and E in Fluoride Induced Uterine Oxidative Stress and Apoptotic Gene Expression in Wistar Rats. *Proc Zool Soc.* 74(2): 189-197.
221. Malin, A. J., Lesseur, C., Busgang, S. A., Curtin, P., Wright, R. O., Sanders, A. P. (2019). Fluoride exposure and kidney and liver function among adolescents in the United States: NHANES, 2013–2016. *Environ Int.* 132: 105012.
222. Mandinic, Z., Curcic, M., Antonijevic, B., Carevic, M., Mandic, J., Djukic-Cosic, D., Lekic, C. P. (2010). Fluoride in drinking water and dental fluorosis. *Sci Total Environ.* 408(17): 3507-3512.
223. Mandinic, Z., Curcic, M., Antonijevic, B., Lekic, C. P., Carevic, M. (2009). Relationship between fluoride intake in Serbian children living in two areas with different natural levels of fluorides and occurrence of dental fluorosis. *Food Chem Toxicol.* 47(6): 1080-1084.

224. Manivannan, J., Sinha, S., Ghosh, M., Mukherjee, A. (2013). Evaluation of multi-endpoint assay to detect genotoxicity and oxidative stress in mice exposed to sodium fluoride. *Mutat Res.* 751(1): 59-65.
225. Marinho, V. C., Chong, L. Y., Worthington, H. V., Walsh, T. (2016). Fluoride mouthrinses for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 7(7): Cd002284.
226. Marinho, V. C., Worthington, H. V., Walsh, T., Clarkson, J. E. (2013). Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* (7): Cd002279.
227. Marthaler, T. M. (2013). Salt fluoridation and oral health. *Acta Med Acad.* 42(2): 140-155.
228. Martínez-Mier, E. A. (2011). Fluoride: Its Metabolism, Toxicity, and Role in Dental Health. *J Evid Based Integr Med.* 17(1): 28-32.
229. Matak, P., Zumerle, S., Mastrogiannaki, M., El Balkhi, S., Delga, S., Mathieu, J. R. R., Canonne-Hergaux, F., Poupon, J., Sharp, P. A., Vaulont, S., Peyssonnaud, C. (2013). Copper Deficiency Leads to Anemia, Duodenal Hypoxia, Upregulation of HIF-2 α and Altered Expression of Iron Absorption Genes in Mice. *PLOS ONE.* 8(3): e59538.
230. Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., Núñez de Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 32(8): 595-603.
231. Mazurek-Mochol, M. (2002). Interaction between fluorine and zinc after long-term oral administration into the digestive system of rats]. *Ann Acad Med Stetin.* 48: 75-83.
232. McKinley, K., McLellan, I., Gagné, F., Quinn, B. (2019). The toxicity of potentially toxic elements (Cu, Fe, Mn, Zn and Ni) to the cnidarian *Hydra attenuata* at environmentally relevant concentrations. *Sci Total Environ.* 665: 848-854.
233. McPherson, C. A., Zhang, G., Gilliam, R., Brar, S. S., Wilson, R., Brix, A., Picut, C., Harry, G. J. (2018). An Evaluation of Neurotoxicity Following Fluoride Exposure from Gestational Through Adult Ages in Long-Evans Hooded Rats. *Neurotox Res.* 34(4): 781-798.
234. Mendoza-Schulz, A., Solano-Agama, C., Arreola-Mendoza, L., Reyes-Márquez, B., Barbier, O., Del Razo, L. M., Mendoza-Garrido, M. E. (2009). The effects of fluoride on cell migration, cell proliferation, and cell metabolism in GH4C1 pituitary tumour cells. *Toxico Lett.* 190(2): 179-186.
235. Meng, X., Yao, Y., Ma, Y., Zhong, N., Alphonse, S., Pei, J. (2021). Effect of fluoride in drinking water on the level of 5-methylcytosine in human and rat blood. *Environ Toxicol Pharmacol.* 81: 103511.
236. Miao, K., Zhang, L., Yang, S., Qian, W., Zhang, Z. (2013). Intervention of selenium on apoptosis and Fas/FasL expressions in the liver of fluoride-exposed rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 36(3): 913-920.
237. Miranda, G. H. N., Gomes, B. A. Q., Bittencourt, L. O., Aragao, W. A. B., Nogueira, L. S., Dionizio, A. S., Buzalaf, M. A. R., Monteiro, M. C., Lima, R. R. (2018). Chronic Exposure to Sodium Fluoride Triggers Oxidative Biochemistry Misbalance in Mice: Effects on Peripheral Blood Circulation. *Oxid Med Cell Longev.* 27(8379123).
238. Misra, H. P., Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 247(10): 3170-3175.
239. Mittal, M., Flora, S. J. (2007). Vitamin E supplementation protects oxidative stress during arsenic and fluoride antagonism in male mice. *Drug Chem Toxicol.* 30(3): 263-281.
240. Mochidome, P., Simoes, A., Ganzerla, E., Souza, D., Nogueira, F., Nicolau, J. (2013). Effects of single exposure of sodium fluoride on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in salivary gland of rats. *Oxid Med Cellr Longev.* 2013: 7 pages.
241. Møller, P., Knudsen, L. E., Loft, S., Wallin, H. (2000). The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9(10): 1005-1015.

242. Mondal, P., Shaw, P., Dey Bhowmik, A., Bandyopadhyay, A., Sudarshan, M., Chakraborty, A. Chattopadhyay, A. (2021). Combined effect of arsenic and fluoride at environmentally relevant concentrations in zebrafish (*Danio rerio*) brain: Alterations in stress marker and apoptotic gene expression. *Chemosphere*. 269: 128678.
243. Monnier, V. M., Nemet, I., Sell, D. R. Weiss, M. F. (2011). Transition metals and other forms of oxidative protein damage in renal disease. *Studies on Renal Disorders*, Springer: 25-50
244. Monsour, P. Kruger, B. (1985). Effect of Fluoride On Soft-Tissues in Vertebrates. *Fluoride*. 18(1): 53-61.
245. Morales-González, J. A., Gutiérrez-Salinas, J., García-Ortiz, L., Del Carmen Chima-Galán, M., Madrigal-Santillán, E., Esquivel-Soto, J., Esquivel-Chirino, C. González-Rubio, M. G.-L. Y. (2010). Effect of sodium fluoride ingestion on malondialdehyde concentration and the activity of antioxidant enzymes in rat erythrocytes. *Int J Mol Sci*. 11(6): 2443-2452.
246. Moseley, R., Waddington, R. J., Sloan, A. J., Smith, A. J., Hall, R. C. Embery, G. (2003). The influence of fluoride exposure on dentin mineralization using an in vitro organ culture model. *Calcif Tissue Int*. 73(5): 470-475.
247. Mou, S., Qin, S., Hu, Q. Duan, X. (2004). Effect of fluorine, selenium and cadmium on antioxidant and microelements in rat's body. *Wei Sheng Yan Jiu*. 33(2): 211-213.
248. Mukai, F. H. Goldstein, B. D. (1976). Mutagenicity of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. *Science*. 191(4229): 868-869.
249. Muleviciene, A., Sestel, N., Stankeviciene, S., Sniukaite-Adner, D., Bartkeviciute, R., Rascon, J. Jankauskiene, A. (2018). Assessment of Risk Factors for Iron Deficiency Anemia in Infants and Young Children: A Case-Control Study. *Breastfeed Med*. 13(7): 493-499.
250. Mullen, J. (2005). History of Water Fluoridation. *Br Dent J*. 199(7): 1-4.
251. Narayanaswamy, M., Basha Piler, M., Begum, S. Ahmed, F. (2009). Fluoride-induced neuronal oxidative stress and its amelioration by antioxidants in developing rats. *Fluoride*. 42: 179.
252. NCBI. (2021). PubChem Compound Summary for CID 24934, Sodium selenite. National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-selenite>.
253. NCBI. (2021). PubChem Element Summary for AtomicNumber 34, Selenium. National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/element/Selenium>.
254. Nedeljković, M., Antonijević, B. Matović, V. (1991). Simplified sample preparation for fluoride determination in biological material. *Analyst*. 116(5): 477-478.
255. Nieder, R., Benbi, D. K. Reichl, F. X. (2018). Microelements and Their Role in Human Health. *Soil Components and Human Health*. Dordrecht, Springer Netherlands: 317-374. 978-94-024-1222-2.
256. Niedernhofer, L. J., Daniels, J. S., Rouzer, C. A., Greene, R. E. Marnett, L. J. (2003). Malondialdehyde, a Product of Lipid Peroxidation, Is Mutagenic in Human Cells *. *Journal of Biological Chemistry*. 278(33): 31426-31433.
257. Nikolic, D., Stanimirovic, J., Bjelogrić, P. Isenovic, E. (2014). Oxidative stress and the role of antioxidative treatment in diabetes mellitus. *Oxid Antioxid Med Sci*. 3: 9.
258. NRC (2006). *Fluoride in Drinking Water: A Scientific Review of EPA Standards*. Washington, DC, The National Academies Press.
259. O'Mullane, D. M., Baez, R. J., Jones, S., Lennon, M. A., Petersen, P. E., Rugg-Gunn, A. J., Whelton, H. Whitford, G. M. (2016). Fluoride and Oral Health. *Comm Dent Health*. 33(2): 69-99.
260. Obradovic, M., Bogdanovic, N., Radak, D. Isenovic, E. R. (2015). Editorial: oxidative stress in pathophysiological conditions. *Curr Vasc Pharmacol*. 13(2): 226-228.
261. Obradovic, M., Essack, M., Zafirovic, S., Sudar-Milovanovic, E., Bajic, V. P., Van Neste, C., Trpkovic, A., Stanimirovic, J., Bajic, V. B. Isenovic, E. R. (2020). Redox control of vascular biology. *Biofactors*. 46(2): 246-262.

262. OECD (2016). Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. Paris, OECD iLibrary.
263. Oldfield, J. E. (2006). Selenium: A historical perspective. Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health. Hatfield, Berry and Gladyshev. Boston, MA, Springer US: 1-6.978-0-387-33827-9.
264. Olive, P. L., Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc.* 1(1): 23-29.
265. Omran, D. A., Darweesh, S. K., Fouad, H., Mahmoud, M., Saif, S., Fared, A., Hassany, M., Mobarak, L., El-Tahawy, M. A., Yosry, A. (2017). Serum Zinc Deficiency and its Relation to Liver Fibrosis in Chronic HCV: a Real-Life Egyptian Study. *Biol Trace Elem Res.* 179(1): 1-7.
266. Öner, A., Dede, S., Yur, F., Öner, A. (2020). The effect of vitamin C and vitamin E on DNA damage, oxidative status, and some biochemical parameters in rats with experimental fluorosis. *Fluoride.* 53: 154-163.
267. Ostling, O., Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 123(1): 291-298.
268. Ouyang, Z., Yang, B., Yi, J., Zhu, S., Lu, S., Liu, Y., Li, Y., Li, Y., Mehmood, K., Hussain, R., Ijaz, M., Guo, J., Tang, Z., Li, Y., Zhang, H. (2021). Exposure to Fluoride induces apoptosis in liver of ducks by regulating Cyt-C/Caspase 3/9 signaling pathway. *Ecotoxicol Environ Safety.* 224: 112662.
269. Owumi, S. E., Aliyu-Banjo, N. O., Danso, O. F. (2019). Fluoride and diethylnitrosamine coexposure enhances oxido-inflammatory responses and caspase-3 activation in liver and kidney of adult rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 33(7): e22327.
270. Oyagbemi, A. A., Adejumobi, O. A., Jarikre, T. A., Ajani, O. S., Asenuga, E. R., Gbadamosi, I. T., Adedapo, A. D. A., Aro, A. O., Ogunpolu, B. S., Hassan, F. O., Falayi, O. O., Ogunmiluyi, I. O., Omobowale, T. O., Arojoye, O. A., Ola-Davies, O. E., Saba, A. B., Adedapo, A. A., Emikpe, B. O., Oyeyemi, M. O., Nkadimeng, S. M., McGaw, L. J., Kayoka-Kabongo, P. N., Oguntibeju, O. O., Yakubu, M. A. (2021). Clofibrate, a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Alpha (PPAR α) Agonist, and Its Molecular Mechanisms of Action against Sodium Fluoride-Induced Toxicity. *Biol Trace Elem Res.* 200(3): 1220-1236.
271. Oyagbemi, A. A., Omobowale, T. O., Ola-Davies, O. E., Asenuga, E. R., Ajibade, T. O., Adejumobi, O. A., Afolabi, J. M., Ogunpolu, B. S., Falayi, O. O., Saba, A. B. (2018). Luteolin-mediated Kim-1/NF-kB/Nrf2 signaling pathways protects sodium fluoride-induced hypertension and cardiovascular complications. *Biofactors.* 44(6): 518-531.
272. Pal, P., Mukhopadhyay, P. K. (2021). Fluoride induced testicular toxicities in adult Wistar rats. *Toxicol Mech Met.* 31(5): 383-392.
273. Pawa, S., Ali, S. (2004). Liver necrosis and fulminant hepatic failure in rats: protection by oxyanionic form of tungsten. *Biochim Biophys Acta.* 1688(3): 210-222.
274. Peng, J.-R., Lu, T.-T., Chang, H.-T., Ge, X., Huang, B., Li, W.-M. (2016). Elevated Levels of Plasma Superoxide Dismutases 1 and 2 in Patients with Coronary Artery Disease. *BioMed Res Intern.* 2016: 3708905-3708905.
275. Pereira, M., Dombrowski, P. A., Losso, E. M., Chioca, L. R., Da Cunha, C., Andreatini, R. (2011). Memory impairment induced by sodium fluoride is associated with changes in brain monoamine levels. *Neurotox Res.* 19(1): 55-62.
276. Perera, T., Ranasinghe, S., Alles, N., Waduge, R. (2018). Effect of fluoride on major organs with the different time of exposure in rats. *Environ Health Prev Med.* 23(1): 018-0707.
277. Petersen, P. E., Lennon, M. A. (2004). Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach. *Community Dent Oral Epidemiol.* 32(5): 319-321.
278. Petersson, L. G. (2013). The role of fluoride in the preventive management of dentin hypersensitivity and root caries. *Clin Oral Investig.* 17(1): 63-71.

279. Phillips, D. H.Arlt, V. M. (2009). Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. *Exs.* 99: 87-110.
280. Picco, D. C., Delbem, A. C., Sasaki, K. T., Sumida, D. H.Antoniali, C. (2014). The effect of chronic treatment with fluoride on salivary activity, tooth, and bone in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 387(4): 321-328.
281. Pizzino, G.Irrera, N. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017: 8416763.
282. Podder, S., Chattopadhyay, A.Bhattacharya, S. (2011). Reduction in fluoride-induced genotoxicity in mouse bone marrow cells after substituting high fluoride-containing water with safe drinking water. *J Appl Toxicol.* 31(7): 703-705.
283. Podder, S., Chattopadhyay, A., Bhattacharya, S.Ranjan, M. (2010). Histopathology and cell cycle alteration in the spleen of mice from low and high doses of sodium fluoride. *Fluoride.* 43: 237-245.
284. Prakash, B., Sabal, S. K., Verma, R., Pj, J.Soni, I. (2018). Sodium fluoride-induced oxidative stress and histological changes in liver of swiss albino mice and amelioration by ocimum sanctum linn. *Asian J Pharm Clin Res.* 11(9): 195-199.
285. Pretty, I. A. (2016). High Fluoride Concentration Toothpastes for Children and Adolescents. *Caries Res.* 50 Suppl 1: 9-14.
286. Puty, B., Bittencourt, L. O., Nogueira, I. C., Buzalaf, M. A. R., Oliveira, E. H.Lima, R. R. (2021). Human cultured IMR-32 neuronal-like and U87 glial-like cells have different patterns of toxicity under fluoride exposure. *PLOS ONE.* 16(6): e0251200.
287. Qian, W., Miao, K., Li, T.Zhang, Z. (2013). Effect of selenium on fluoride-induced changes in synaptic plasticity in rat hippocampus. *Biol Trace Elem Res.* 155(2): 253-260.
288. Qian, W., Miao, K., Li, T.Zhang, Z. (2013). Effect of selenium on fluoride-induced changes in synaptic plasticity in rat hippocampus. *Biol Trace Elem Res.* 155(2): 253-260.
289. Radovanovic, J., Banjac, K., Obradovic, M.Isenovic, E. R. (2021). Antioxidant enzymes and vascular diseases. *Explor Med.* 2(6): 544-555.
290. Ran, L.-Y., Xiang, J., Zeng, X.-X., Tang, J.-l., Dong, Y.-T., Zhang, F., Yu, W.-F., Qi, X.-L., Xiao, Y., Zou, J., Deng, J.Guan, Z.-Z. (2021). Integrated transcriptomic and proteomic analysis indicated that neurotoxicity of rats with chronic fluorosis may be in mechanism involved in the changed cholinergic pathway and oxidative stress. *J Trace Elem Med Biol.* 64: 126688.
291. Reddy, G. B., Khandare, A. L., Reddy, P. Y., Rao, G. S., Balakrishna, N.Srivalli, I. (2003). Antioxidant defense system and lipid peroxidation in patients with skeletal fluorosis and in fluoride-intoxicated rabbits. *Toxicol Sci.* 72(2): 363-368.
292. Reddy, K. P., Sailaja, G.Krishnaiah, C. (2009). Protective effects of selenium on fluoride induced alterations in certain enzymes in brain of mice. *J Environ Biol.* 30(5 Suppl): 859-864.
293. Ribeiro, D., Lima, P., Marques, M.Salvadori, D. (2006). Lack of DNA damage induced by fluoride on mouse lymphoma and human fibroblast cells by single cell gel (comet) assay. *Braz Dent J.* 17: 91-94.
294. Ribeiro, D. A., Marques, M. E., de Assis, G. F., Anzai, A., Poleti, M. L.Salvadori, D. M. (2004). No relationship between subchronic fluoride intake and DNA damage in Wistar rats. *Caries Res.* 38(6): 576-579.
295. Ribeiro, D. A., Yujra, V. Q., da Silva, V. H. P., Claudio, S. R., Estadella, D., de Barros Viana, M.Oshima, C. T. F. (2017). Putative mechanisms of genotoxicity induced by fluoride: a comprehensive review. *Environ Sci Pollut Res Int.* 24(18): 15254-15259.
296. Rocha-Amador, D. O., Calderón, J., Carrizales, L., Costilla-Salazar, R.Pérez-Maldonado, I. N. (2011). Apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in children exposed to arsenic and fluoride. *Environ Toxicol Pharmacol.* 32(3): 399-405.

297. Roohani, N., Hurrell, R., Kelishadi, R., Schulin, R. (2013). Zinc and its importance for human health: An integrative review. *J Res Med Sci : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 18(2): 144-157.
298. Roychowdhury, R., Khan, M. H., Choudhury, S. (2019). Chapter 16 - Physiological and Molecular Responses for Metalloid Stress in Rice—A Comprehensive Overview. *Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance*. Hasanuzzaman, Fujita, Nahar and Biswas, Woodhead Publishing: 341-369. 978-0-12-814332-2.
299. Royer, A., Sharman, T. (2021). Copper Toxicity. *StatPearls*. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.
300. Salim, S. (2017). Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther*. 360(1): 201-205.
301. Samanta, A., Bidyut, B., Das, N. (2016). Fluoride Intoxication and Possible Changes in Mitochondrial Membrane Microviscosity and Organ Histology in Rats. *Int J Sci Res*. 5: 547-550.
302. Saukko, P., Pollak, S. (2013). Histopathology. *Encyclopedia of Forensic Sciences (Second Edition)*. Siegel, Saukko and Houck. Waltham, Academic Press: 210-216. 978-0-12-382166-9.
303. Sellers, C. (2004). The Artificial Nature of Fluoridated Water: Between Nations, Knowledge, and Material Flows. *Osiris*. 19: 182-200.
304. Selmeçi, L. (2011). Advanced oxidation protein products (AOPP): novel uremic toxins, or components of the non-enzymatic antioxidant system of the plasma proteome? *Free Radic Res*. 45(10): 1115-1123.
305. Sena, C. M., Leandro, A., Azul, L., Seiça, R., Perry, G. (2018). Vascular Oxidative Stress: Impact and Therapeutic Approaches. *Front Physiol*. 9(1668).
306. Shahidi, F. (2015). 1 - Antioxidants: Principles and applications. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. Shahidi, Woodhead Publishing: 1-14. 978-1-78242-089-7.
307. Shanmugam, T., Abdulla, S., Yakulasamy, V., Selvaraj, M., Mathan, R. (2018). A mechanism underlying the neurotoxicity induced by sodium fluoride and its reversal by epigallocatechin gallate in the rat hippocampus: Involvement of Nrf2/Keap-1 signaling pathway. *J Basic Appl Zool*. 79(1): 1-19.
308. Shao, S., Ma, B., Wang, C., Chen, Y., Zhang, W. (2022). A Review on the Removal of Magnesium and Fluoride in Zinc Hydrometallurgy. *J Sustain Met*. 8(1): 25-36.
309. Sharma, P., Verma, P. K., Sood, S., Singh, R., Gupta, A., Rastogi, A. (2021). Distribution of Fluoride in Plasma, Brain, and Bones and Associated Oxidative Damage After Induced Chronic Fluorosis in Wistar Rats. *Biol Trace Elem Res*. 200(4): 1710-1721.
310. Shearer, T. R., Ridlington, J. W. (1976). Fluoride-selenium interaction in the hard and soft tissues of the rat. *J Nutr*. 106(4): 451-456.
311. Shenkin, A. (2006). Micronutrients in health and disease. *Postgraduate medical journal*. 82(971): 559-567.
312. Sherwood, A., Meena, D., Gutmann, J., Amaechi, B. (2020). Clinical Performance of Enamel Microabrasion for Esthetic Management of Stained Dental Fluorosis Teeth. *Oper Dent*. 46(1).
313. Shi, C., Zheng, B., Jia, H., Abdullah, A., Muhammed, F., Liu, Y. (2020). Gastrodin alleviates bone damage by modulating protein expression and tissue redox state. *FEBS Open Bio*. 10: 2404-2416.
314. Shuhua, X., Ziyou, L., Ling, Y., Fei, W., Sun, G. (2012). A role of fluoride on free radical generation and oxidative stress in BV-2 microglia cells. *Mediators Inflamm*. 2012: 102954.
315. Sieber, F., Muir, S. A., Cohen, E. P., Fish, B. L., Mäder, M., Schock, A. M., Althouse, B., J. Moulder, J. E. (2011). Dietary selenium for the mitigation of radiation injury: effects of selenium dose escalation and timing of supplementation. *Radiat Res*. 176(3): 366-374.
316. Silverstone, L. M. (1982). The effect of fluoride in the remineralization of enamel caries and caries-like lesions in vitro. *J Public Health Dent*. 42(1): 42-53.

317. Singh, M.Kanwar, K. C. (1981). Effect of fluoride on copper, manganese and zinc in bone and kidney. *Bull Environ Contam Toxicol.* 26(3): 428-431.
318. Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R.Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175(1): 184-191.
319. Sivapriya, E., Sridevi, K., Periasamy, R., Lakshminarayanan, L.Pradeepkumar, A. R. (2017). Remineralization ability of sodium fluoride on the microhardness of enamel, dentin, and dentinoenamel junction: An in vitro study. *J Conserv Dent.* 20(2): 100-104.
320. Slayton, R. L., Urquhart, O., Araujo, M. W. B., Fontana, M., Guzmán-Armstrong, S., Nascimento, M. M., Nový, B. B., Tinanoff, N., Weyant, R. J., Wolff, M. S., Young, D. A., Zero, D. T., Tampi, M. P., Pilcher, L., Banfield, L.Carrasco-Labra, A. (2018). Evidence-based clinical practice guideline on nonrestorative treatments for carious lesions: A report from the American Dental Association. *J Am Dent Assoc.* 149(10): 837-849.e819.
321. Slob, W. (2014). Benchmark dose and the three Rs. Part II. Consequences for study design and animal use. *Critical Reviews in Toxicology.* 44(7): 568-580.
322. Slob, W.Pieters, M. N. (1998). A Probabilistic Approach for Deriving Acceptable Human Intake Limits and Human Health Risks from Toxicological Studies: General Framework. *Risk Analysis.* 18(6): 787-798.
323. Sodani, I. J. (2016). Histopathological changes of mice liver induced by an Aloe vera whole leaf extract. *Iraqi J Sci.* 57(3B): 1906-1917.
324. Song, C., Fu, B., Zhang, J., Zhao, J., Yuan, M., Peng, W., Zhang, Y.Wu, H. (2017). Sodium fluoride induces nephrotoxicity via oxidative stress-regulated mitochondrial SIRT3 signaling pathway. *Sci Rep.* 7(1): 672.
325. Squier, M. K.Cohen, J. J. (2001). Standard quantitative assays for apoptosis. *Mol Biotechnol.* 19(3): 305-312.
326. Strunecka, A.Strunecky, O. (2020). Mechanisms of Fluoride Toxicity: From Enzymes to Underlying Integrative Networks. *Appl Sci.* 10(20): 7100.
327. Su, Y. J., Lu, L. H., Choi, W. M.Chang, K. S. (2001). Survival after a massive hydrofluoric acid ingestion with ECG changes. *Am J Emerg Med.* 19(5): 458-460.
328. Sun, D. (2014). The potential of endogenous neurogenesis for brain repair and regeneration following traumatic brain injury. *Neural regener res.* 9(7): 688.
329. Sun, L., Gao, Y., Zhang, W., Liu, H.Sun, D. (2014). Effect of high fluoride and high fat on serum lipid levels and oxidative stress in rabbits. *Environ toxicol pharmacol.* 38(3): 1000-1006.
330. Sun, L., Yu, F., Xu, Z., Zeng, X., Ferreri, M.Han, B. (2010). Alteration of osteocalcin mRNA expression in ovine osteoblasts in dependence of sodium fluoride and sodium selenite medium supplementation. *Acta Biol Hung.* 61(1): 52-63.
331. Sun, Z., Li, S., Guo, Z., Li, R., Wang, J., Niu, R.Wang, J. (2018). Effects of Fluoride on SOD and CAT in Testis and Epididymis of Mice. *Biol Trace Elem Res.* 184(1): 148-153.
332. Takaishi, K.Kinoshita, H. (2021). Human Vascular Smooth Muscle Function and Oxidative Stress Induced by NADPH Oxidase with the Clinical Implications. *Cells.* 10(8): 1947.
333. Tang, W., Xiao, Y., Long, Y., Li, Y., Peng, F., Zhu, C., He, T., Lou, D.Zhu, Y. (2021). Sodium fluoride causes oxidative damage to silkworm (*Bombyx mori*) testis by affecting the oxidative phosphorylation pathway. *Ecotoxicol Environ Saf.* 218: 112229.
334. Tanwir, K., Amna, Javed, M. T., Shahid, M., Akram, M. S.Ali, Q. (2021). Chapter 32 - Antioxidant defense systems in bioremediation of organic pollutants. *Handbook of Bioremediation.* Hasanuzzaman and Prasad, Academic Press: 505-521.978-0-12-819382-2.
335. Taylor, R. W.Turnbull, D. M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature reviews. Genetics.* 6(5): 389-402.
336. ten Cate, J. M.van Loveren, C. (1999). Fluoride mechanisms. *Dent Clin North Am.* 43(4): 713-742, vii.

337. Thangapandiyan, S. Miltonprabu, S. (2014). Ameliorative effect of epigallocatechin gallate on sodium fluoride induced oxidative stress mediated metabolism in rat. *Int J Pharmacol Toxicol.* 2(2): 76-85.
338. Thylstrup, A. Fejerskov, O. (1978). Clinical appearance of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histologic changes. *Community Dent Oral Epidemiol.* 6(6): 315-328.
339. Tinggi, U. (2008). Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ Health Prev Med.* 13(2): 102-108.
340. Tkachenko, H., Kurhaluk, N., Skaletska, N., Maksin, V. Osadowski, Z. (2021). Elemental Status and Lipid Peroxidation in the Blood of Children with Endemic Fluorosis. *Biol Trace Elem Res.* 199(4): 1237-1245.
341. Toumba, K. J., Twetman, S., Splieth, C., Parnell, C., van Loveren, C. Lygidakis, N. (2019). Guidelines on the use of fluoride for caries prevention in children: an updated EAPD policy document. *Eur Arch Paediatr Dent.* 20(6): 507-516.
342. Tsanidou, E., Nena, E., Rossos, A., Lendengolts, Z., Nikolaidis, C., Tselebonis, A. Constantinidis, T. C. (2015). Caries prevalence and manganese and iron levels of drinking water in school children living in a rural/semi-urban region of North-Eastern Greece. *Environ Health Prev Med.* 20(6): 404-409.
343. Tsunoda, M., Aizawa, Y., Nakano, K., Liu, Y., Horiuchi, T., Itai, K. Tsunoda, H. (2005). Changes in fluoride levels in the liver, kidney, and brain and in neurotransmitters of mice after subacute administration of fluoride. *Fluoride.* 38: 284-292.
344. Turner, C. H., Hasegawa, K., Zhang, W., Wilson, M., Li, Y. Dunipace, A. J. (1995). Fluoride Reduces Bone Strength in Older Rats. *J Dent Res.* 74(8): 1475-1481.
345. Tylanda, C. A., Syracuse Research, C. United, S. (2003). Toxicological profile for fluorides, hydrogen fluoride, and fluorine. Atlanta, Ga., Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
346. Ullah, R., Zafar, M. S. Shahani, N. (2017). Potential fluoride toxicity from oral medicaments: A review. *Iran J Basic Med Sci.* 20(8): 841-848.
347. Urquhart, O., Tampi, M. P., Pilcher, L., Slayton, R. L., Araujo, M. W. B., Fontana, M., Guzmán-Armstrong, S., Nascimento, M. M., Nový, B. B., Tinanoff, N., Weyant, R. J., Wolff, M. S., Young, D. A., Zero, D. T., Brignardello-Petersen, R., Banfield, L., Parikh, A., Joshi, G. Carrasco-Labra, A. (2019). Nonrestorative Treatments for Caries: Systematic Review and Network Meta-analysis. *J Dent Res.* 98(1): 14-26.
348. Varol, E., Icli, A., Aksoy, F., Bas, H. A., Sutcu, R., Ersoy, I. H., Varol, S. Ozaydin, M. (2013). Evaluation of total oxidative status and total antioxidant capacity in patients with endemic fluorosis. *Toxicol Ind Health.* 29(2): 175-180.
349. Vieira, A. P. G. F., Hancock, R., Limeback, H., Maia, R. Grynopas, M. D. (2004). Is Fluoride Concentration in Dentin and Enamel a Good Indicator of Dental Fluorosis? *J Dent Res.* 83(1): 76-80.
350. Vieira, A. R. (2021). Fluoride Toxicity. *Monogr Oral Sci.* 30: 140-148.
351. Villa, A., Anabalon, M., Zohouri, V., Maguire, A., Franco, A. M. Rugg-Gunn, A. (2010). Relationships between fluoride intake, urinary fluoride excretion and fluoride retention in children and adults: an analysis of available data. *Caries Res.* 44(1): 60-68.
352. Vogel-González, M., Musa-Afanah, D., Rivera Gil, P. Vicente, R. (2021). Zinc Favors Triple-Negative Breast Cancer's Microenvironment Modulation and Cell Plasticity. *Inter J Molecul Sci.* 22(17): 9188.
353. Vucić, V., Isenović, E. R., Adžić, M., Ruzdijić, S. Radojčić, M. B. (2006). Effects of gamma-radiation on cell growth, cycle arrest, death, and superoxide dismutase expression by DU 145 human prostate cancer cells. *Braz J Med Biol Res.* 39(2): 227-236.
354. Wallace, D. F. (2016). The Regulation of Iron Absorption and Homeostasis. *Clin Biochem Rev.* 37(2): 51-62.

355. Walna, B., Kurzyca, I., Bednorz, E., Kolendowicz, L. (2013). Fluoride pollution of atmospheric precipitation and its relationship with air circulation and weather patterns (Wielkopolski National Park, Poland). *Environ Monit Assess.* 185(7): 5497-5514.
356. Wang, A., Xia, T., Ru, R., Yuan, J., Chen, X., Yang, K. (2004). Antagonistic effect of selenium on oxidative stress, DNA damage, and apoptosis induced by fluoride in human hepatocytes. *Res Rep.* 37: 107-116.
357. Wang, Y. X., Xiao, X., Zhan, X. A. (2018). Antagonistic effects of different selenium sources on growth inhibition, oxidative damage, and apoptosis induced by fluorine in broilers. *Poult Sci.* 97(9): 3207-3217.
358. Wang, Z. H., Li, X. L., Yang, Z. Q., Xu, M. (2010). Fluorine-induced apoptosis and lipid peroxidation in human hair follicles in vitro. *Biol Trace Elem Res.* 137(3): 280-288.
359. Wei, W., Pang, S., Sun, D. (2019). The pathogenesis of endemic fluorosis: Research progress in the last 5 years. *J Cell Mol Med.* 23(f): 2333–2342.
360. Wheeler, M. W., Bailer, A. J. (2013). An empirical comparison of low-dose extrapolation from points of departure (PoD) compared to extrapolations based upon methods that account for model uncertainty. *Regul Toxicol Pharmacol.* 67(1): 75-82.
361. WHO (2000). Air Quality Guidelines for Europe Second Edition. Air Quality Guidelines for Europe Second Edition, WHO regional publications. European series ; No. 91: 142-146. 92 890 1358 3.
362. WHO (1994). Fluorides and oral health : report of a WHO Expert Committee on Oral Health Status and Fluoride Use [meeting held in Geneva from 22 to 28 November 1993]. Geneva, World Health Organization.
363. WHO (1984). Fluorine and fluorides. International Programme on Chemical, Safety United Nations Environment, Programme International Labour, Organization Ipc Task Group on Environmental Health Criteria for Fluorine Fluorides.
364. WHO (2011). Guidelines for Drinking-water Quality, Selenium in Drinking-water. https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/selenium.pdf.
365. WHO (1987). International Programme on Chemical Safety, United Nations Environment Programme, International Labour Organization & World Health Organization Selenium. Retrieved ISBN 92 4 154258 6
366. WHO (2019). Preventing disease through healthy environments: inadequate or excess fluoride: a major public health concern. Geneva, World Health Organization.
367. Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Zingraff, J., Jungers, P., Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 49(5): 1304-1313.
368. Wong, M. C., Clarkson, J., Glenny, A. M., Lo, E. C., Marinho, V. C., Tsang, B. W., Walsh, T., Worthington, H. V. (2011). Cochrane reviews on the benefits/risks of fluoride toothpastes. *J Dent Res.* 90(5): 573-579.
369. Xavier, A. M., Rai, K., Hegde, A. M., Shetty, S. (2015). A spectroscopic and surface microhardness study on enamel exposed to beverages supplemented with lower iron concentrations. *J Clinic Ped Dent.* 39(2): 161-167.
370. Xiu-wen, C., Chang-wu, W., Si-yu, Z. (2017). Serum oxidative stress products among residents living in endemic area of coal-burning fluorosis. *Chinese J Pub Health.* 33(5): 824-827.
371. Yang, S. Y., Zhang, L., Miao, K. K., Qian, W., Zhang, Z. G. (2013). Effects of selenium intervention on chronic fluorosis-induced renal cell apoptosis in rats. *Biol Trace Elem Res.* 153(1-3): 237-242.
372. Yu, J., Gao, Y., Sun, D. (2013). Effect of fluoride and low versus high levels of dietary calcium on mRNA expression of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the bone of rats. *Biol Trace Elem Res.* 152(3): 387-395.

373. Yu, R. A., Xia, T., Wang, A. G.Chen, X. M. (2006). Effects of selenium and zinc on renal oxidative stress and apoptosis induced by fluoride in rats. *Biomed Environ Sci.* 19(6): 439-444.
374. Yu, X., Xia, L., Zhang, S., Zhou, G., Li, Y., Liu, H., Hou, C., Zhao, Q., Dong, L., Cui, Y., Zeng, Q., Wang, A.Liu, L. (2021). Fluoride exposure and children's intelligence: Gene-environment interaction based on SNP-set, gene and pathway analysis, using a case-control design based on a cross-sectional study. *Environ Int.* 155: 106681.
375. Yue, B., Zhang, X., Li, W., Wang, J., Sun, Z.Niu, R. (2020). Fluoride exposure altered metabolomic profile in rat serum. *Chemosphere.* 258: 127387.
376. Zero, D. T., Raubertas, R. F., Pedersen, A. M., Fu, J., Hayes, A. L.Featherstone, J. D. B. (1992). Studies of Fluoride Retention by Oral Soft Tissues after the Application of Home-use Topical Fluorides. *J Dent Res.* 71(9): 1546-1552.
377. Zhan, X. A., Wang, M., Xu, Z. R., Li, W. F.Li, J. X. (2006). Effects of fluoride on hepatic antioxidant system and transcription of Cu/Zn SOD gene in young pigs. *J Trace Elem Med Biol.* 20(2): 83-87.
378. Zhang, J., Song, J., Zhang, J., Chen, X., Zhou, M., Cheng, G.Xie, X. (2013). Combined effects of fluoride and cadmium on liver and kidney function in male rats. *Biol Trace Elem Res.* 155(3): 396-402.
379. Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y.Dong, W. (2016). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2016: 4350965.
380. Zhang, R., Liao, Q. X., Ke, L. L., Ouyang, W.Zhang, Z. G. (2017). The molecular mechanisms of the renal injury in fluorosis induced by drinking water with a high fluoride ion content and the effects of selenium intervention. *Fluoride.* 50: 105-120.
381. Zhao, Y., Zhang, L., Ouyang, X., Jiang, Z., Xie, Z., Fan, L., Zhu, D.Li, L. (2019). Advanced oxidation protein products play critical roles in liver diseases. *Eur J Clin Invest.* e13098.
382. Zhao, Y., Zhao, J., Wang, J.Wang, J. (2017). Fluoride exposure changed the structure and the expressions of HSP related genes in testes of pubertal rats. *Chemosphere.* 184: 1080-1088.
383. Zheng, X., Sun, Y., Ke, L., Ouyang, W.Zhang, Z. (2016). Molecular mechanism of brain impairment caused by drinking-acquired fluorosis and selenium intervention. *Environ Toxicol Pharmacol.* 43: 134-139.
384. Zhong, N., Yao, Y., Ma, Y., Meng, X., Sowanou, A.Pei, J. (2021). Effects of Fluoride on Oxidative Stress Markers of Lipid, Gene, and Protein in Rats. *Biol Trace Elem Res.* 199(6): 2238-2246.
385. Zhou, B.-H., Zhao, J., Liu, J., Jiliang, Z., Li, J.Wang, H.-W. (2015). Fluoride-induced oxidative stress is involved in the morphological damage and dysfunction of liver in female mice. *Chemosphere.* 139: 504-511.
386. Zoller WH, R. D. (1976). Selenium in the atmosphere. Proceedings of the symposium on selenium-tellurium in the environment. Pittsburgh, PA, Industrial Health Foundation: 54-66.

8. BIOGRAFIJA

Jelena Radovanović Dimitrijević je rođena 29.11.1989. godine u Beogradu. Završila je Petu gimnaziju u Beogradu i dobitnik je Vukove diplome. Školske 2008/2009. godine upisala je osnovne integrisane studije na Stomatološkom fakultetu, Univerzitet u Beogradu. Diplomirala je septembra 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,16 i stekla zvanje doktor stomatologije. U toku studija na Stomatološkom fakultetu je bila autor studentskog rada pod nazivom „Profilaktička primena nimesulida za kontrolu postoperativnog bola nakon hirurškog vađenja umnjaka“, koji je prezentovan na Kongresu studenata biomedicinskih nauka 2012. godine. Pripravnički staž je završila tokom 2014/2015. godine na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Po obavljenom pripravničkom stažu, položila je državni ispit decembra 2015. godine pri Ministarstvu zdravlja Republike Srbije.

Doktorske akademske studije na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu je upisala školske 2015/2016. godine. U okviru doktorske disertacije proučavala je mehanizme subakutne toksičnosti fluorida i protektivno dejstvo selena, kod eksperimentalnih pacova. Pohađala je veliki broj kurseva i edukacija iz oblasti stomatologije i molekularne genetike.

Od 2019. godine zaposlena je u laboratoriji za Radiobiologiju i Molekularnu genetiku na Institutu za nuklearne nauke „Vinča“, Univerzitet u Beogradu, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju. U septembru 2020. godine izabrana je u naučno zvanje – istraživač-saradnik. Trenutno je angažovana na istraživačkoj temi „Hormonska regulacija ekspresije i aktivnosti azot oksid sintaze i natrijum-kalijumove pumpe u eksperimentalnim modelima insulinske rezistencije, dijabetesa i kardiovaskularnih poremećaja“, br. 0802201 čiji je rukovodilac prof. dr Esma Isenović naučni savetnik, u laboratoriji za Radiobiologiju i molekularnu genetiku.

U svom dosadašnjem radu bila je saradnik na sedam publikacija u časopisima međunarodnog značaja, i na jednom poglavlju u knjizi.

Jelena Radovanović Dimitrijević je član Srpskog lekarskog društva i Stomatološke komore

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Jelena Radovanović Dimitrijević

Broj indeksa:4001/2015

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Subakutna toksičnost fluorida i protektivni efekat selena kod eksperimentalnog životinjskog modela”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, _____



Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Jelena Radovanović Dimitrijević

Broj indeksa: 4001/2015

Studijski program: doktorske akademske studije, modul Bazična i klinička istraživanja u stomatologiji

Naslov rada: „**Subakutna toksičnost fluorida i protektivni efekat selena kod eksperimentalnog životinjskog modela**”

Mentor: prof.dr Zoran Mandinić

Komentor: prof.dr Biljana Antonijević

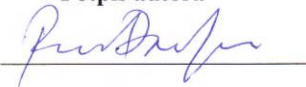
Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjena u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, _____

Potpis autora



Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Subakutna toksičnost fluorida i protektivni efekat selena kod eksperimentalnog životinjskog modela”

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.
Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

U Beogradu, _____

Potpis autora



1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
 2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
 3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
 4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
 5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
 6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.
-