Универзитет у Београду
Стоматолошки факултет

Александра С. Милосављевић

ЋЕЛИЈСКИ И МОЛЕКУЛАРНИ МЕХАНИЗМИ ДЕЈСТВА МЕЛАТОНИНА У ЗУБНОЈ ПУЛПИ И ПАРОТИДНОЈ ПЉУВАЧНОЈ ЖЛЕЗДИ КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ДИЈАБЕТЕС МЕЛИТУСОМ ТИП 2

Докторска дисертација

Београд, 2021

University of Belgrade
School of dental medicine

Aleksandra S. Milosavljević

CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS OF MELATONIN ACTION IN DENTAL PULP AND PAROTID SALIVARY GLAND IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS PATIENTS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

Ментор:

Проф. др Јелена Рогановић, ванредни професор Стоматолошког факултет Универзитета у Београду

Чланови комисије за оцену и одбрану докторске дисертације:

1. Проф. др Јелена Милашин, редовни професор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду

2. Проф. др Југослав Илић, ванредни професор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду

3. Проф. др Наташа Николић Јакоба, ванредни професор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду

4. Проф. др Маја Милетић, ванредни професор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду

5. Др сци. Нина Петровић, виши научни сарадник Института за нуклеарне науке „Винча“- Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду

Датум одбране:

Захвалница

Реализација овог рада не би била могућа без учешћа и подршке великог броја људи. Према свима вама гајим велику захвалност.

Ипак, посебно бих се захвалила свом ментору, проф. др Јелени Рогановић, на указаној прилици, на идејама и мотивацији, на саветима, на великој подршци и поверењу, на издвојеном времену и стрпљењу.

Велику захвалност дугујем проф. др Јелени Милашин на пруженој шанси и обезбеђеним условима за спровођење истраживања на културама ћелија, као и њеном сјајном тиму, мојим драгим колегама.

Захваљујем се проф. др Божидару Брковићу у оквиру чијег пројекта је ова докторска дисертација реализована.

Захваљујем се проф. др Милану Петровићу, асс. др сци. Бојану Целетовићу и др сци. Милану Вучетићу који су омогућили прикупљање узорака за истраживње.

Захваљујем се доц. др Љиљани Ђукић на помоћи и саветима приликом извођења истраживања.

Захваљујем се свим запосленима на Стоматолошком факултету.

Захваљујем се пацијентима који су учествовали у истраживању.

Нарочито се захваљујем својој породици и пријатељима на подршци и поверењу, и пре свега, на безусловној љубави.

У Београду

Александра Милосављевић

Списак скраћеница

ДМ – дијабетес мелитус

МЕЛ – мелатонин

SOD – супероксид дизмутаза

iNOS – индуцибилна азот-моноксид синтаза

NO – азот-моноксид

GDNF – неуротрофни фактор пореклом глијалних ћелија

p300 – хистон ацетилтрансфераза п300

NF-κB – једарни фактор за појачавање капа лаког ланца активираних Б ћелија

COX – циклооксигеназа

МТР – мелатонински рецептори

МТТ – тест редукције тетразолијумове МТТ соли (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*)

NRU – тест уноса неутрално црвене боје

ELISA – ензимска имунолошка метода

*SOD*1 – цитоплазматска супероксид дизмутаза

*SOD*2 – митохондријска супероксид дизмутаза

*SOD*3 – екстрацелуларна супероксид дизмутаза

eNOS – ендотелна азот-моноксид синтаза

nNOS - неурална азот-моноксид синтаза

НГ – нормогликемија

ХГ – хипергликемија

BMI – индекс телесне масе

ГДМ – гестацијски ДМ

Ach – ацетилхолин

NA – норадреналин

МР – мускарински рецептори

IP_3 – инозитол 1, 4, 5-трифосфат

VEGF – васкуларни фактор раста порекла ендотела

BMP-2 – коштани морфогенетски протеин 2

ДНК – дезоксирибонуклеинска киселина

РНК – рибонуклеинска киселина

AGEs – крајњи (одмакли) продукти гликозилације

PKC – протеин киназа Ц

O_2^- – супероксидни анјон

OH – хидроксилни радикал

RO_2 – пероксил радикал

HRO_2^- – хидропероксил радикал

NO_2^- – азот-диоксид

H_2O_2 – водоник пероксид

HOCl – хипохлорна киселина

$ONOO^-$ – пероксинитрит

HNO_2 – нитрозни оксид

RONOO – алкил пероксинитрит

CpG – цитозин-гуанинин динуклеотид раздвојен фосфатом

HATs – хистон ацетилтрансферазе

HDATs – хистон деацетилазе

RANKL – лиганд рецептора-активатора једарног фактора за појачавање капа лаког ланца активираних Б ћелија

OPG – остеопротежерин

*Nrf*2 – фактор 2 повезан са нуклеарним фактором-еритроидом 2

ГИТ – гастроинтестинални тракт

FBS – фетални говђи серум

DMEM – Дулбеков модификовани *Eagle* медијум

AB – антибиотик

DPBS – Дулбеков фосфатни пуфер

NaOCl – натријум-хипохлорит

WST-1 – 2-(4-*Iodophenyl*)-3-(4-*nitrophenyl*)-5-(2,4-*disulfophenyl*)-*2H-tetrazolium sodium salt*, тетразолијумова со

ЋЕЛИЈСКИ И МОЛЕКУЛАРНИ МЕХАНИЗМИ ДЕЈСТВА МЕЛАТОНИНА У ЗУБНОЈ ПУЛПИ И ПАРОТИДНОЈ ПЉУВАЧНОЈ ЖЛЕЗДИ КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ДИЈАБЕТЕС МЕЛИТУСОМ ТИП 2

САЖЕТАК

Дијабетес мелитус (ДМ) тип 2, као хронично метаболичко обољење, праћено је нарушеном хомеостазом у готово свим ткивима у организму. У пљувачним жлездама се манифестује смањеним протоком пљувачке, док је смањен репараторни потенцијал забележен у ткиву зубне пулпе. Имајући у виду да оксидативно-нитрозативни стрес и хронична инфламација у ткивима представљају основне патолошке механизме у настанку компликација ДМ, може се претпоставити повољан утицај антиоксидативно-антиинфламаторних молекула на ток ДМ. У том смислу, примена мелатонина (МЕЛ), са снажним антиоксидантним и антиинфламаторним ефектом, може бити корисна. Истраживања показују протективни ефекат МЕЛ не само у ДМ, већ и у другим обољењима која деле исте патогенетске механизме са ДМ, као што су пародонтопатија, септични шок, неуродегенеративна обољења и одређене врсте тумора. Међутим, до сада није било података о утицају МЕЛ на компликације изазване ДМ у пљувачним жлездама и зубној пулпи. Такође, у циљу проналажења ефикасне терапије компликација ДМ, потребна су додатна истраживања која би употпунила сазнања о молекуларним механизмима којима хипергликемија оштећује ткива.

С тим у вези, циљ овог рада био је да у хуманим ткивима зубне пулпе и паротидне пљувачне жлезде у групи здравих испитаника и у групи испитаника са ДМ тип 2 испитамо и упоредимо ниво експресије протеина МЕЛ; индуцибилне азот-моноксид синтазе (*inducible nitric oxide synthase, iNOS*), значајног проинфламаторног и прооксидативног ензима; неуротрофног фактора пореклом глијалних ћелија (*glial cell derived neurotrophic factor, GDNF*), значајног цитопротективног молекула у условима ћелијског стреса и инфламације; и активност супероксид дизмутазе (*superoxide dismutase, SOD*), ензима који представља прву линију одбране од оксидативног стреса. Затим да се исптају ефекти фармаколошких концентрација МЕЛ (0,1 mM и 1 mM), *in vitro*, на метаболичку активност и вијабилност хуманих ћелија паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе. И на крају, да се испитају ефекти примене фармаколошких концентрација МЕЛ, *in vitro*, на експресију протеина *iNOS, GDNF* и хистон ацетилтрансферазе п300 (*histone acetyltransferase p300, p300*), као и на активност *SOD*, у хуманим културама ћелија паротидне пљувачне жлезде пореклом здравих испитаника и пореклом испитаника са ДМ тип 2, као и у хуманим културама ћелија зубне пулпе у условима нормо- и хипер-гликемије.

У истраживању је учествовало 72 испитаника, при чему је 64 испитаника било укључено у испитивања на ткивима и по четири испитаника за испитивања на ћелијским културама паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе. Сва истраживања су спроведена на клиникама и у лабораторијама Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. Исптаници за испитивања на ткивима били су подељени у две групе, групу здравих испитаника и групу испитаника са ДМ тип 2, са по 16 испитаника по групи. У узорцима ткива, након мануелне хомогенизације ткива у циљу екстракције протеина, применом ензимске имунолошке методе (*enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*) одређене су концентрације МЕЛ, *iNOS* и *GDNF*, док је активност *SOD* одређена спектрофотометријском методом. За третман ћелија МЕЛ, у фармаколошким концентрацијама (0,1 mM и 1 mM), ћелије паротидне пљувачне жлезде изоловане су од два системски здрава испитаника и два испитаника са ДМ тип 2, док су ћелије зубне пулпе биле порекла интактних умњака са завршеним растом корена од четири системски здрава испитаника. Испитивање утицаја фармаколошких концентрација МЕЛ (24 сата), на метаболичку активност и вијабилност ћелија паротидне пљувачне жлезде (за три пацијента) и зубне пулпе (за четири пацијента) спроведено је применом МТТ теста (тест редукције тетразола) и теста уноса неутрално црвене боје (*neutral red uptake, NRU*). Након доказа о биокомпатибилности, испитан је ефекат МЕЛ, *in vitro*, на концентрације *iNOS, p300*

и *GDNF*, и на акивност *SOD* у култури ћелија паротидне пљувачне жлезде (МЕЛ 0,1 mM, 24 сата) и у култури ћелије зубне пулпе, пореклом три пацијента, (МЕЛ 0,1 mM и 1 mM, 24 сата), у условима нормо- и хипер-гликемије (5 mM и 25 mM глукоза), при чему је формирано седам група: 1. нормогликемија, НГ; 2. НГ+0,1 mM МЕЛ; 3. НГ+1 mM МЕЛ; 4. хипергликемија, ХГ; 5. ХГ+0,1 mM МЕЛ; 6. ХГ+1 mM МЕЛ; 7. осмотска контрола ХГ, 25 mM манитол. У ћелијама паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе, након екстракције ћелијских протеина поступком наизменичног замрзавања и одмрзавања ћелија, одређене су концентрације протеина *iNOS, p300* и *GDNF ELISA* методом, док је активност *SOD* одређена спектрофотометријском методом.

Резултати нашег истраживања су показали да је концентрација МЕЛ значајно смањена у ткивима зубне пулпе и паротидне пљувачне жлезде у групи испитаника са ДМ тип 2, у поређењу са групом здравих испитаника, док су концентрације *iNOS* и *GDNF* значајно повећане. Активност *SOD* у ткиву паротидне пљувачне жлезде је значајно повећана у групи испитаника са ДМ тип 2, док у ткиву зубне пулпе није била значајно промењена. Фармаколошке концентрације МЕЛ (0,1 mM и 1 mM, 24 сата) нису утицале на метаболичку активност и вијабилност ћелија зубне пулпе, док је концентрација МЕЛ од 1 mM, али не и концентрација од 0,1 mM, показала цитотоксичан ефекат на ћелије паротидне пљувачне жлезде (вредност МТТ теста смањена за скоро 20%). МЕЛ у концентрацији од 0,1 mM у култури ћелија паротидне пљувачне жлезде пореклом здравих испитаника значајно повећава концентрацију *GDNF* и активност *SOD*, не утичући значајно на концентрације *iNOS* и *p300,* док у култури ћелија пореклом оболелих од ДМ тип 2 значајно смањује повећану активност *SOD*, не утичући значајно на концентрације *iNOS, p300* и *GDNF*. МЕЛ у концентрацији од 0,1 mM у култури ћелија зубне пулпе у условима нормогликемије значајно повећава концентрацију *GDNF*, не утичући на концентрације *iNOS* и *p300* и на активност *SOD*, док у већој концентрацији (1 mM) повећава концентрацију *iNOS*, не утичући на концентрације *GDNF* и *p300* и на активност *SOD*. МЕЛ у концентрацији од 1mM, али не и у концентрацији од 0,1 mM, смањује хипергликемијом-повећане концентрације *iNOS, p300* и *GDNF*, док обе концентрације МЕЛ значајно повећавају хипергликемијом-смањену активност *SOD* у култури ћелија зубне пулпе. Такође, у условима хипергликемије јака позитивна корелација је нађена између концентрација *iNOS* и *p300,* пре и након третмана ћелија зубне пулпе МЕЛ (1 mM).

Резултати наше студије показују да је концентрација МЕЛ значајно смањена у ткивима зубне пулпе и паротидне пљувачне жлезде оболелих од ДМ тип 2, и да МЕЛ у фармаколошким концентрацијама делује протективно на ћелије зубне пулпе у условима *in vitro* хипергликемије тако што нормализује повећане концентрације *iNOS* и *GDNF*, и смањену активност *SOD*.

Кључне речи: дијабетес мелитус тип 2, мелатонин, зубна пулпа, паротидна пљувачна жлезда, индуцибилна азот-моноксид синтаза, хистон ацетилтрансфераза п300, нервни фактора пореклом глијалних ћелија, супероксид дизмутаза.

Научна област: Стоматолошке науке

Ужа научна област: Базичне стоматолошке науке

УДК број:

CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS OF MELATONIN ACTION IN DENTAL PULP AND PAROTID SALIVARY GLAND IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS PATIENTS

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (DM), as a chronic metabolic disorder, leads to impaired overall homeostasis in the body. In the salivary glands, it causes reduced salivary flow, while reduced reparative potential has been observed in the dental pulp tissue. Given that oxidative-nitrosative stress and chronic inflammation in tissues are the underlying pathological mechanisms in the development diabetic complications, a favorable effect of antioxidant-antiinflammatory molecules on the course of DM could be assumed. In that sense, the use of melatonin (MEL), with a strong antioxidant and anti-inflammatory effect, could be beneficial. Studies showed a protective effect of MEL not only in DM, but also in other diseases that share the same pathogenetic mechanisms with DM, such as periodontitis, septic shock, neurodegenerative diseases and certain types of tumors. However, so far there have been no data on the effect of MEL on diabetic complications in the salivary glands and dental pulp. Also, in order to find an effective therapy for DM complications, additional researches are needed to supplement the knowledge of the molecular mechanisms by which hyperglycemia causes tissue injury.

In that regard, the aim of this study was to examine the levels of MEL, inducible nitric oxide synthase (iNOS), an important proinflammatory and prooxidative mediator, glial cell derived neurotrophic factor (GDNF), a significant cytoprotective molecule under cellular stress and inflamation, and the activity of superoxide dismutase (SOD), that represents the first line of defense against oxidative stress, in human dental pulp tissue (hDP) and parotid salivary gland (hPG) of healthy non-diabetic patients (ND) and type 2 diabetic patients (T2D). Next, to examine effects of pharmacological concentrations of MEL (0.1 mM and 1 mM), in vitro, on metabolic activity and viability of human parotid gland cells culture (hPGCs) and dental pulp cells culture (hDPCs), and after that to investigate the effects of pharmacological concentrations of MEL on SOD activity, as well as on iNOS, GDNF, and histone acetyltransferase p300 (p300) levels, an enzyme involved in controlling of iNOS gene expression, in hPGCs of ND and T2D, and in hDPCs under in vitro normoglycemia (NG) and hyperglycemia (HG).

72 patients were included in this study, of which 64 were divided into two groups, a group of non-diabetic patients (ND) and a group of T2D, with 16 subjects per group, for analysis on hDP and hPG, while from the remaining eight patients were obtained tissues samples for isolation of hDPCs and hPGCs (four subjects each). All researches was conducted at clinics and in laboratories of the Faculty of Dental Medicine University of Belgrade. In tissues samples, after manual tissue homogenization for protein extraction, MEL, iNOS and GDNF concentrations were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), while SOD activity was assessed by a spectrophotometric method. For the treatment of cells cultures with MEL, at pharmacological concentrations (0.1 mM and 1 mM), parotid salivary gland cells were isolated from two systemically healthy patients and two patients with DM type 2, while dental pulp cells were of intact wisdom tooth origin with completed root growth of four healthy patients. Effects of pharmacological concentrations of MEL (24h) on metabolic activity and viability of hPGCs (for three patients) and hDPCs (for four patients) was assessed by MTT assay (tetrazole reduction assay) and by the neutral red uptake (NRU) assay. After getting evidence of biocompatibility, the effects of MEL, in vitro, on iNOS, p300 and GDNF concentrations, and on SOD activity, were assessed in hPGCs (MEL 0.1 mM, 24 hours) and in hDPCs (MEL 0.1 mM and 1 mM, 24 hours, for three patient) in of normo- and hyper-glycemic (5 mM and 25 mM glucose)conditions, and seven groups were formed: 1. normoglycemia, NG; 2. NG+0.1 mM MEL; 3. NG+1 mM MEL; 4. hyperglycemia, HG; 5. HG+0.1 mM MEL; 6. HG+1 mM MEL; 7. osmotic control HG, 25 mM mannitol. In the hPGCs and hDPCs, after extraction of cell proteins by three cycles of cells freezing/thawing, the concentrations of iNOS, p300 and GDNF proteins were determined by ELISA, while the SOD activity was determined by spectrophotometric method.

The results of our study showed that the MEL level was significantly decreased in hDP and hPG of T2D, compared with the ND, while the concentrations of iNOS and GDNF were significantly increased. The activity of SOD was significantly increased in hPG of T2D, while in hDP it was not significantly changed. Pharmacological concentrations of MEL (0.1 mM and 1 mM, 24 h) did not affect metabolic activity and viability of hDPCs, while MEL at concentration of 1 mM, but not at 0.1 mM, showed a cytotoxic effect on hPGCs (MTT test value reduced by almost 20%). MEL at concentration of 0.1 mM in hPG of ND significantly increases the concentration of GDNF and SOD activity, without affecting the concentrations of iNOS and p300, while in hPG of T2D significantly reduces increased SOD activity, without affecting iNOS, p300 and GDNF concentrations. MEL at a concentration of 0.1 mM in hDP under normoglycemic condition significantly increases the concentration of GDNF, without affecting the concentrations of iNOS and p300 and SOD activity, while at a higher concentration (1 mM) increases the concentration of iNOS, without affecting GDNF and p300 protein concentration and SOD activity. MEL at a concentration of 1 mM, but not at a concentration of 0.1 mM, in hDP in hyperglycemic condition, normalizes increased concentrations of iNOS, p300 and GDNF, while both concentrations of MEL significantly increase decreased SOD activity. Also, in hDP in hyperglycemia, a strong positive correlation was found between iNOS and p300 concentrations, before and after treatment of cells with MEL (1 mM).

Our results showed significantly decreased level of MEL in hDP and hPG of T2D, and that MEL, at pharmacological concentrations, normalised levels of iNOS and GDNF, and SOD activity in hDPCs under in vitro hyperglycemic condition suggesting its protective effects against HG-induced injuries of hDPCs.

Key words: diabetes mellitus (DM) type 2, melatonin, dental pulp, parotid gland, inducible nitric oxide synthase (iNOS), histone acetyltransferase p300 (p300), glial cell derived neurotrophic factor (GDNF), superoxide dismutase (SOD).

Scientific field: Dental Sciences

Scientific subfield: Basic Dental Sciences

САДРЖАЈ

УВОД 1

Епидемиолошки и патофизиолошки аспекти дијабетеса мелитуса 1

Утицај дијабетеса мелитуса на оралну хомеостазу 2

Значај пљувачке у очувању оралне хомеостазе и промене у пљувачним жлездама у дијабетесу мелитусу 3

Хроничне компликације дијабетеса мелитуса у ткиву зубне пулпе 7

Патифизиолошки механизми укључени у настанак хроничних компликација дијабетеса мелитуса 8

Хипергликемија 8

Оксидативно-нитрозативни стрес 9

Епигенетичке промене и хипергликемијска меморија 13

Мелатонин и орална ткива 15

Мелатонин и дијабетес мелитус 19

ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДЕ 22

Популација испитаника 22

Сакупљање и припрема хуманих узорака ткива паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе 22

Изолација хуманих ћелија паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе 23

In vitro испитивање цитотоксичности фармаколошких концентрација мелатонина на хуманим културама ћелија паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе 24

Третман мелатонином хуманих култура ћелија паротидне пљувачне жлезде пореклом од здравих испитаника и пореклом од испитаника са ДМ тип 2 25

Третман мелатонином хуманих култура ћелија зубне пулпе у условима *in vitro* нормо- и хипер-гликемије 26

Квантификација протеина мелатонина, *iNOS*, *p300* и *GDNF* имуноензимском *ELISA* методом 26

Одређивање активности *SOD* спектрофотометријском методом 27

Статистичка обрада података 27

РЕЗУЛТАТИ 28

Карактеристике испитаника укључених у сакупљање узорака ткива паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе 28

Резултати лабораторијских испитивања на хуманим узорцима ткива и на хуманим културама ћелија паротидне пљувачне жлезде 30

Концентрације протеина мелатонина, *iNOS* и *GDNF* и активност *SOD* у ткиву паротидне пљувачне жлезде здравих испитаника и испитаника са ДМ тип 2 30

Резултати испитивања цитотоксичности фармаколошких концентрација мелатонина на културама ћелија паротидне пљувачне жлезде 31

Концентрације протеина *iNOS, p300* и *GDNF* и активност *SOD* у култури ћелија паротидне пљувачне жлезде пореклом од здравих испитаника и пореклом од испитаника са ДМ тип 2 31

Концентрације протеина *iNOS, p300* и *GDNF* и активност *SOD* у култури ћелија паротидне пљувачне жлезде пореклом од здравих испитаника након примене мелатонина, *in vitro* 32

Концентрације протеина *iNOS, p300* и *GDNF* и активност *SOD* у култури ћелија паротидне пљувачне жлезде пореклом од испитаника са ДМ тип 2 након примене мелатонина, *in vitro* 32

Резултати лабораторијских испитивања на хуманим узорцима ткива зубне пулпе и на хуманим културама ћелија зубне пулпе 37

Концентрације протеина мелатонина, *iNOS* и *GDNF* и активност *SOD* у ткиву зубне пулпе здравих испитаника и испитаника са ДМ тип 2 37

Резултати испитивања цитотоксичности фармаколошких концентрација мелатонина на културама ћелија зубне пулпе 38

Концентрације протеина *iNOS, p300* и *GDNF* и активност *SOD* у култури ћелија зубне пулпе у условима *in vitro* хипергликемије 38

Концентрације протеина *iNOS, p300* и *GDNF* и активност *SOD* у култури ћелија зубне пулпе након примене мелатонина у условима нормогликемије, *in vitro* 39

Концентрације протеина *iNOS, p300* и *GDNF* и активност *SOD* у култури ћелија зубне пулпе након примене мелатонина у условима хипергликемије, *in vitro* 39

ДИСКУСИЈА 44

ЗАКЉУЧЦИ 50

ЛИТЕРАТУРА 51

БИОГРАФИЈА АУТОРА 72

Изјава о ауторству 73

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада . 74

Изјава о коришћењу 75

УВОД

Епидемиолошки и патофизиолошки аспекти дијабетеса мелитуса

Дијабетес мелитус (ДМ) представља прогресивно метаболичко обољење које настаје услед релативног или апсолутног дефицита у секрецији инсулина и/или поремећаја у његовој сигнализацији, односно немогућношћу организма да ефикасно искористи произведен инсулин, што за последицу има појаву хипергликемије уз поремећај метаболизма угљених хидрата, масти и протеина [1, 2]. Због високе стопе преваленције, распрострањености и појаве тешких пратећих компликација ДМ представља озбиљан глобални јавно-здравствени и економски проблем данашњице. Број оболелих од ДМ је у сталном порасту, посебно у земљама у развоју, у које спада и наша земља, а пре свега у Индији, Кини, Бразилу и афричким државама. Број оболелих од ДМ 2011. године износио је 108 милиона, 2014. године 422 милиона са проценом да ће до 2045. године од ДМ оболети више од 700 милиона људи. Ови подаци указују на пандемијски карактер ДМ. Услед високе преваленције недијагностикованих случајева, процењује се да је број оболелих од ДМ већи за око 50%. Као хронично метаболичко обољење, ДМ је праћен појавом системских компликација које узрокују настанак коморбидитета и повећавају ризик од превремене смрти, пре свега услед кардиоваскуларних компликација. Годишње од ДМ и његових компликација умире око 3,7 милиона људи, при чему су исхемијска болест срца и мождани удар узрок смрти у 80% случајева [3, 4]. У Извештају Института за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут" из 2020. године објављено је да у Републици Србији од ДМ болује 770 хиљада људи и да ће 2040. године сваки пети грађанин Србије имати ДМ. У Србији од ДМ и његових компликација годишње умире око 3000 људи, при чему је број умрлих вероватно и већи због високе преваленције недијагностикованих случајева (43%) и услед нетачног евидентирања узрока смрти [5].

Оптимална концентрација глукозе у крви (гликемија) одржава се уравнотеженим дејством глукорегулаторних хормона (инсулин, глукагон, амилин, инкретини, адреналин, кортизол и хормон раста), који регулишући брзину ресорпције егзогене глукозе, њен транспорт, метаболизам и депоновање у ткивима, уз, такође, контролу синтезе и ендогене глукозе, спречавају хипергликемију током оброка и хипогликемију између оброка. У физиолошким условима оптимална гликемија се одржава у веома уском опсегу, до 6,1 mM, наште (након периода ноћног гладовања од најмање 8 сати), и до 7,8 mM, два сата након оброка. Најважнију улогу у регулацији постпрандијалне гликемије (концентрација глукозе у крви након оброка) има инсулин. Инсулин синтетишу β ћелије Лангерхансових острваца панкреаса, пре свега као одговор на повећану постпрандијалну гликемију, јер ће инсулин примарно посредујући у транспорту глукозе из крви у инсулин зависна ткива и секундарно инхибцијом стварања ендогене глукозе, успоставити оптималну гликемију након оброка. У инсулин зависна ткива спадају масно ткиво, срчани мишић и скелетни мишићи. У скелетне мишиће се транспортује и до 75% постпрандијалне глукозе. С обзиром да инсулин, као анаболички хормон, регулише не само метаболизам угљених хидрата (стимулише гликогенезу и инхибира глуконеогенезу и гликогенолизу), већ утиче и на метаболизам масти и протеина (стимулише липогенезу и синтезу протеина, и инхибира липолизу и катаболизам протеина), ДМ је праћен дисрегулацијом скоро свих метаболичких процеса који су под контролом инсулина, што се манифестује нарушеном целокупном метаболичком хомеостазом у организму [6, 7].

Са становишта етиопатогенетских фактора који ремете синтезу и сигнализацију инсулина разликују се ДМ тип 1, ДМ тип 2, гестацијски ДМ (ГДМ) и други специфични типови ДМ. ДМ тип 1 се манифестује потпуним или релативним изостанком инсулина, услед деструкције β ћелија Лангерхансових острваца. Јавља се у два облика, као ДМ тип 1А и 1Б, при чему је ДМ тип 1А заступљен у 5-10% свих случајева ДМ и представља имунолошки

облик ДМ, код којег организам ствара аутоантитела против β ћелија Лангерхансових острваца. Са друге стране, ДМ тип 1Б се изузетно ретко јавља и у питању је идиопатска форма ДМ, код које узрок деструкције β ћелија није познат, јер изостаје стварање аутоантитела. ДМ тип 2 обухвата 90-95% свих случајева ДМ и манифестује се предоминантном инсулинском резистенцијом у јетри, скелетним мишићима и у масном ткиву уз релативни недостатак инсулина, или се манифестује предоминантним недостатком инсулина уз релативну инсулинску резистенцију [8]. У факторе ризика за настанак ДМ тип 2 спадају сложени и недовољно разјашњени наследни предиспонирајући фактори удружени са епигенетичким факторима као што су стрес, старење популације, гојазност и/или неадекватна исхрана, пушење, седентарни начин живота, неуредно спавање и урбанизација. У Америци се све већи број случајева ДМ тип 2 дијагностикује у млађој популацији, те трећина дијагностикованих случајева је међу адолесцентима [9]. Значајан фактор ризика за настанак ДМ тип 2 и кардиоваскуларних болести представља предијабетес, који се карактерише повећаном концентрацијом глукозе у крви која није довољно повећана да би се сматрала ДМ, али се не може сматрати ни физиолошком. У предијабетесу гликемија наште је повећана (5,6-6,9 mM) и/или је толеранција на глукозу смањена (7,8-11 mM). ГДМ се јавља у трудноћи када се хипергкликемија по први пут дијагностикује. Преваленција ГДМ износи око 7%. Хипергликемија је обично пролазног карактера и након порођаја се повлачи, али представља фактор ризика за настанак ДМ, стога је код жена са историјом ГДМ неопходно доживотно радити скриниг на предијабетес и дијабетес. Појава инсулинске резистенције представља кључни предиспонирајући фактор за настанак ДМ тип 2, предијабетеса и ГДМ. Инсулинска резистенција се манифестује смањеном реактивношћу инсулин зависних ткива на дејство инсулина при његовој нормалној концентрацији у крви. У циљу очувања оптимална гликемија инсулинска резистенција је праћена појавом компензаторне хиперинсулинемије, коју прати настанак и дислипидемије. У зависности од наследне предиспозиције особе, инсулинска резистенција често траје годинама док се клинички не развије одређено обољење/обољења. ДМ тип 2 настаје када секреција инсулина, услед дисфункције или апоптозе β ћелија панкреаса, више није довољна да компензује смањену осетљивост периферних ткива на дејство инсулина [10]. Остали специфични типови ДМ настају услед других секундарних обољења као што су цистична фиброза панкреаса, карцином панкреаса, Кушингов синдром, или као последица генских поремећаја у функцији β ћелија и сигнализацији инсулина, или као последица узимања одређених врста лекова [8].

Утицај дијабетеса мелитуса на оралну хомеостазу

Као прогресивно метаболичко обољење, ДМ је праћен настанком озбиљних акутних метаболичких и хроничних системских компликација. У акутне компликације ДМ спадају кетоацидоза, хипергликемијска кома, лактична ацидоза и хипогликемија. Међутим, хроничне макроваскуларне (атеросклероза коронарних, церебралних и периферних крвних судова, повишен крвни притисак, и као њихове акутне компликације срчани и мождани удар) и микроваскуларне (дијабетесна ретинопатија, неуропатија, нефропатија, улцерације стопала) компликације најчешћи су разлог морбидитета и морталитета код оболелих од ДМ, јер доводе до губитка вида, бубрежне и срчане инсуфицијенције или ткивне исхемије која за последицу може имати ампутацију екстремитета [11]. ДМ је праћен и чешћом појавом инфекција [12], како услед циркулаторних поремећаја тако и због измењеног имунолошког одговора [13]. Настанку хроничних компликација ДМ подложна су и орална ткива, те је орална хомеостаза код оболелих од ДМ често нарушена. Функционалним и морфолошким поремећајима може бити захваћено ткиво пљувачних жлезда [14, 15], ткиво зубне пулпе [16], пародонтална ткива [17, 18] и ткиво оралне слузокоже [19]. Стога као пратеће компликације ДМ у усној дупљи настају хипосаливација и ксеростомија, отежано жвакање, гутање (дисфагија) и говор, измењено чуло укуса (дисгеузија), чешћи губитка зуба услед веће преваленције

пародонтопатије и учесталијег неуспешног исхода ендодонтског третмана, чешћа појава инфекција, пре свега гљивичних, отежано зарастање постекстракционих рана, као и већа преваленција преканцерозних лезија оралне слузокоже [19, 20]. Пародонтопатија се наводи шестом компликацијом ДМ. Код оболелих од ДМ, посебно код пацијената са лошом контролом гликемије, ризик за настанак пародонтопатије је повећан три пута [21]. Са друге стране, и пародонтопатија представља фактор ризика за настанак ДМ и његових хроничних компликација [22]. Наиме, код пацијената са ДМ тип 2 након каузалне терапије хроничне пародонтопатије контрола гликемије и инсулинска осетљивост су побољшане, што указује да контрола инфламације пародонталних ткива утиче повољно на превенцију и ток ДМ и његових компликација [23]. Имајући у виду тесну повезаност оралне хомеостазе са целокупним здрављем, као и са одржавањем оптималне гликемије њено очување код оболелих од ДМ је од посебне важности [24].

Значај пљувачке у очувању оралне хомеостазе и промене у пљувачним жлездама у дијабетесу мелитусу

Захваљујући својим бројним функцијама пљувачка има кључну улогу у очувању оралне хомеостазе. Пљувачка представља прву линију одбране од инфекција у усној дупљи. Својим компонентама учествује како у специфичној, тако и у неспецифичној одбрани од микроорганизама [25, 26]. Пуферски систем пљувачке, пре свега бикарбонатни и фосфатни пуфер, одржавају *pH* пљувачке у распону од 6,1 до 7,8, што се сматра физиолошком вредношћу, чиме пљувачка регулише *pH* усне дупље и зубног плака (биофилм) и тако смањује деминерализацију чврстих зубних ткива. Пљувачка потпомаже оздрављење оралне слузокоже, учествује у самочишћењу усне дупље и метаболизму оралног биофилма. Захваљујући високој концентрацији јона калцијума и фосфата учествује и у матурацији и реминерализацији глеђи [27]. Лубрикантна улога пљувачке је веома значајна у говору, жвакању, гутању и заштити оралне слузокоже од иритација. Растварањем хране пљувачка регулише чуло укуса. Учествује и у почетном варењу скроба и масти и има значајну улогу у ретенцији и ношењу зубних протеза, јер је пљувачка неопходан медијум за формирање вакума између тоталне зубне протезе и оралне слузокоже, који је од пресудног значаја у ретенцији и стабилизацији тоталних зубних протеза [28]. Поред тога, пљувачне жлезде путем ентеро-саливарног метаболизма нитрата, NO_3, учествују и у хомеостази азот-моноксида (*NO*). Наиме 25% нитрата из крви доспева у пљувачку и усну дупљу где одређене бактерије део нитрата преводе у нитрите, NO_2, који се у желуцу делом преводе у *NO*, а делом доспевају у крвоток где се потом преводе у *NO*. Транспорт NO_3 се у највећој мери обавља у паротидној пљувачној жлезди, преко транспортера сијалина чији поремећај функције стога може потенцијално нарушити NO_3 - NO_2 - *NO* равнотежу у крви [29].

Пљувачка настаје као продукт пљувачних жлезда чија је основна улога да стварају, модификују и секретују пљувачку [30]. Према величини класификују се на велике и мале пљувачне жлезде. Великих пљувачних жлезда има три пара, паротидна, субмандибуларна и сублингвална пљувачна жлезда, док малих пљувачних жлезда има од 600 до 1000 и дифузно су распоређене у субмукози оралне слузокоже, изузев у гингиви и предњем делу тврдог непца [31]. Дневно се излучи између 0,5 и 1,5 L укупне (мешовите) пљувачке [32], при чему велике пљувачне жлезде излуче око 90%, док мале пљувачне жлезде секретују око 10% укупне пљувачке [31]. Субмандибуларне жлезде доминантно секретују нестимулисану пљувачку, око 70%, док стимулисану пљувачку доминантно секретују паротидне жлезде, барем 50% [33].

Пљувачне жлезде, као паренхиматозни органи, грађене су од високо диферентованог жлезданог епитела организованог у ацинусе и систем изводних канала, при чему ацинуси заузимају око 80% жлезданог паренхима, док остатак паренхима чине изводни канали [34]. Ацинуси представљају основне функционалне јединице пљувачних жлезда. У зависности од

типа пљувачке коју секретују разликују се серозни, мукозни и мешовити- серомукозни ацинуси. Паротидне жлезде и Фон Ебнерове жлезде грађене су од серозних ацинуса који секретују серозну, слабо вискозну пљувачку која је богата амилазом (птијалин), липазом и протеинама богатих пролином. Сублингвалне и палатиналне жлезде секретују углавном мукозну пљувачку која је вискозна и богата гликопротеинима (муцинима), док остале жлезде, грађене од серомукозних ацинуса, секретују мешовиту пљувачку. Ацинусне и дукталне ћелије учествују и у секрецији протеина, значајних у одржавању оралне хомеостазе, при чему се у пљувачним жлездама секретује чак 85% протеина пљувачке [30].

Пљувачка настаје ултрафилтрацијом крвне плазме, при чему се у првој фази, у лумен ацинуса, ослобађа примарна изотонична пљувачка која се затим, у другој фази, пролазећи кроз систем канала, модификује појачаном ресорпцијом натријума и хлорида, те су у односу на крвну плазму пљувачка излучује у усну дупљу као хипотоничан секрет пљувачних жлезда. Коначан састав пљувачке зависи од човековог општег здравственог стања, односно постојања обољења и узимања лекова, од исхране, оралне хигијене, старости и генетске предиспозиције [30]. Секреција пљувачке и саливарних протеина је под примарном контролом вегетативног нервног система уз мањи допринос ендокрине и паракрине регулације [35]. Вегетативна нервна влакна инервишу не само ацинусне и миоепителне ћелије, већ и крвне судове пљувачних жлезда. Парасимпатикус и симпатикус остварују дуалну синергистичку инервацију ацинусног епитела и миоепителних ћелија, с тим што је заступљеност парасимпатичке и симпатичке инервације различита у различитим деловима једне жлезде и између различитих пљувачних жлезда код исте врсте, као и у истој жлезди између различитих врста [36]. Главни неуротрансмитер парасимпатичке трансмисије у пљувачним жлездама је ацетилхолин (*Ach*), док је главни симпатички неуротрансмитер норадреналин (*NA*) [37]. Кључну улогу у секрецији флуида има парасимпатикус ослобађањем и везивањем *Ach* за мускаринске рецепторе (МР) на жлезданом епителу. МР су трансмембрански рецептори удружени са Г протеином, међу којима најзначајнију улогу у секрецији пљувачке имају M_3P, са мањим доприносом и M_1P. О значају МР у секрецији пљувачке показује истраживање на трансгеним мишевима код којих недостатак M_1P и M_3P доводи до скоро потпуног изостанка секреције пљувачке [38]. *Ach*, као примарни ћелијски гласник, везивањем за M_3P доводи до активације α_q субјединице Г протеина и покретања трансдукционог сигнала који укључује активацију фосфолипазе Ц β која разлаже фосфатидил-инозитолдифосфата у инозитол 1, 4, 5-трифосфат (IP_3) и диацилглицерол. IP_3, као секундарни ћелијски гласник, везујући се за своје рецепторе на едоплазматичном ретикулуму, који представља депо калцијума у ћелији, повећава ослобађање калцијума неопходног за активацију јонских канала за хлор и калијум. Прелазак хлорида у лумен ацинуса праћен је настанком негативног електрохемијског градијента који компензују јони натријума, при чему је формирање комплекса Na^+Cl^- праћено уласком воде у лумен ацинуса, пре свега преко аквапорина 5, и настанком изотоничне пљувачке [39]. Парасимпатичка инервација учествује у мањој мери и у секрецији протеина, доводи до контракције миоепителних ћелија и до повећаног протока крви кроз жлезду. Са друге стране, симпатикус своју улогу остварује ослобађањем и везивањем *NA*, као примарног гласника, за адренергичке рецепторе. Стимулација симпатикуса утиче, пре свега, на квалитативна својства пљувачке, уз мањи допринос у секрецији флуида, јер симпатикус примарно стимулише синтезу и секрецију протеина. Поред тога, симпатикус стимулише контракцију миоепителних ћелија и изазива вазоконстрикцију крвних судова пљувачне жлезде [40]. У регулацији секреције пљувачке, поред *Ach* и *NA*, укључени су и други нехолинергички и неадренергички трансмитери, који модулирају холинергичку и адренергичку трансмисију, као што су вазоактивни интестинални пептид, супстанца П, *NO*, енкефалин, неурокинин А, неуропептид *Y*, питуитарни активатор аденилат циклазе, брадикинин, пептид сродан калцитонину, хиперполаришући фактор порекла ендотела и ангиотензин II [41]. Одржавање нормалног протока крви кроз жлезду је неопходан предуслов за одржавање нормалног протока пљувачке. Проток крви кроз жлезду је, пре свега, под контролом вегетативне инервације која

је делом посредована функцијом ендотела кроз ослобађање *NO* као значајног вазодилататорног молекула [42, 43]. Посредством вегетативне стимулације одржава се и трофичка функција паренхима жлезде. Наиме, хронична парасимпатектомија код паса доводи до редукције тежине субмандибуларне жлезде за 30%, док симпатектомија доводи до редукције тежине паротидне жлезде пацова за 10%, уз значајно смањење максималног секреторног одговора на парасимпатичку стимулацију [36]. Вегетативни нервни систем има значајну улогу у развоју али и у регенерацији жлезданог паренхима [34]. Постојање аутономно-епителне комуникације је неопходан предуслов, не само за очување секреторне функције жлезда и одржавање нормалног протока пљувачке, већ и за успешну регенерацију жлезданог паренхима након оштећења [44]. Значајну улогу у развоју и очувању фунционалног интегритета аутономно-епителне комуникације у пљувачним жлездама имају неуротрофни фактори [34]. Неуротрофни фактори настају пре свега у нервном систему, али и у периферним ткивима у којима могу и да се складиште, као што је случај са тромбоцитима [45]. Представљају протеинске молекуле укључене у развој и преживљавање одређених популација нервних ћелија, али су значајни у хомеостази и физиолошким функцијама и других ћелија осим нервних [46]. Описане су различите категорије молекула који испољавају улогу неуротрофних фактора, као што су неуротрофини, трансформишући фактори раста *β*, хематопоетски цитокини, инсулину слични фактори раста, фибробластни фактори раста, епителни фактори раста и други [47]. Неуротрофни фактор пореклом глијалних ћелија (*glial cell line–derived neurotrophic factor, GDNF*) структурно припада фамилији трансформишућих фактора раста *β* пореклом глијалних ћелија и има значајну улогу у развоју централног и периферног нервног система, учествује у преживљавању и морфолошкој диференцијацији, пре свега допаминергичких, али и моторних, сензорних и вегетативних нервних влакана. У миоепителним ћелијама мукозних пљувачних жлезда мишева врло је заступљен и у мањој мери у серозним пљувачним жлездама, али је његова улога у миоепителним ћелијама неиспитана [48]. У недавним истраживањима *GDNF* се наводи као значајан фактор у регенерацији пљувачних жлезда након зрачне терапије [49, 50]. Значајно повећана експресија *GDNF* у ткиву субмандибуларне пљувачне жлезде мишева забележена је и до три месеца након зрачне терапије, при чему је нарочито заступљен у популацији матичних ћелија. Показано је да *GDNF* код људи и код мишева стимулише преживљавање и пролиферацију матичних ћелија субмандибуларне пљувачне жлезде и да егзогена локална примена *GDNF* у субмандибуларну пљувачну жлезду мишева, пре или након зрачне терапије, значајно повећава секрецију пљувчке [49, 50].

У клиничким студијама и у студијама на експерименталним моделима показано је да ДМ често за последицу има смањено лучење пљувачке (хипосаливација) уз појаву ксеростомије и поремећај састава пљувачке. Хипосаливација постоји када је проток стимулисане пљувачке мањи од 0,5-0,7 ml/min и проток нестимулисане пљувачке мањи од 0,1 ml/min [51, 52], док ксеростомија представља субјективни осећај сувоће у устима који код пацијената изазива непријатност при јелу и говору [53]. Јавља се када су квалитативна својства пљувачке измењена и/или када је секреција пљувачке мања од губитка флуида који се дешава гутањем, апсорпцијом преко оралне слузокоже и евапорацијом [54]. У литератури се наводи да чак 30-43% оболелих од ДМ има ксеростомију која је у јакој корелацији са хипосаливацијом (88%) [55]. Поред ДМ, и друга обољења (аутоимуна обољења, неуродегенеративна и психијатријска обољења) и стања (дехидратација, стрес), као и зрачна терапија тумора у пределу главе и врата и узимање одређених лекова често узрокују појаву хипосливације и ксеростомије [56]. Код оболелих од ДМ хипосаливација уз измењена и квалитативна својства пљувачке [14, 57] праћена је повећаном преваленцијом каријеса и ерозија глеђи, пародонтопатијом, гљивичним и бактеријским инфекцијама оралне слузокоже, уз појаву непријатног задаха (халитозе), глосодинија (пецкање и жарење оралне слузокоже) и отежаног говора [58, 59]. Хипосаливација погодује и настанку улцерација оралне слузокоже повезаних са ношењем зубних протеза [51, 60-63]. Услед отежаног жвакања, гутања и ношење тоталних

зубних протеза, ксеростомија и хипосаливација представљају факторе ризика за настанак малнутриције [24, 60]. Стога очување протока пљувачке и њеног састава од пресудног је значаја за очување оралне хомеостазе у ДМ.

Mata et al. су показали да је код пацијената са добро контролисаним ДМ тип 1 и 2 секреција нестимулисане и стимулисане пљувачке значајно смањена уз постојање поремећаја у органској и неорганској компоненти пљувачке [64]. У студији *Watanabe et al*. показано је да је код пацова са експериментално изазваним ДМ тип 1 осетљивост мускаринских рецептора на пилокарпин смањена, као и секреција укупне пљувачке за чак 70% [65]. И на моделу спонтаног ДМ након стимулације пилокарпином проток пљувачке је смањен за око 67%, док је проток крви кроз субмандибуларну жлезду смањен за 13,6% [66]. За очување функционалног интегритета паренхима пљувачних жлезда неопходна је очуваност вегетативне (парасимпатичке и симпатичке) инервације ткива жлезде, постојање нормалног протока крви кроз жлезду, као и очуваност секреторне функције ацинусних ћелија, а показано је да у ДМ може доћи до поремећаја свих наведених елемената, комбинацијом морфолошких и функционалних поремећаја у виду липидне вакуолизације, атрофије и фиброзе паренхима, у виду поремећаја у неуротрансмисији и смањеног протока крви кроз жлезду, као и у виду поремећаја калцијумског сигналног пута у ацинусним ћелијама. Паротодна и субмандибуларна пљувачна жлезда нису исто подложне настанку оштећења, што се може објаснити разликама у грађи које условљавају њихову различиту метболичку активност, различиту осетљивост на циркулаторне молекуле (глукоза, инсулин) и на поремећај у дотоку крви [67]. Код пацијената са ДМ описана је појава сијалоаденозе паротидне пљувачне жлезде, ређе субмандибуларне, која представља асимптоматско билатерално увећање жлезде као последица инфилтрације жлезданог паренхима мастима [68, 69]. Сијалоаденоза у појединим случајевима чак претходи постављању дијагнозе ДМ [68], а са прогресијом дијабетичне неуропатије и дислипидемије долази до хипофункције паротидне пљувачне жлезде [69]. Којим ћелијским и молекуларним механизмима ДМ узрокује настанак морфолошких и функционалних промена у пљувачним жлездама није у потпуности познато, али чак и у условима добро контролисане гликемије и без клничких показатеља дисфункције пљувачних жлезда дијабетес изазива значајне поремећаје у паренхиму субмандибуларне и паротидне пљувачне жлезде. У субмандибуларној пљувачној жлезди увећани ацинуси су, вероватно, последица поремећаја у метаболизму глукозе, док се интраћелијске алтерације манифестују смањеним бројем секреторних гранула и њиховим одложеним пражњењем, смањеном величином митохондрија и појавом масних капљица у ацинусним ћелијама [14]. Очување хомеостазе сигналног пута калцијума у ацинусним ћелијама основни је предуслов за њихово нормално функционисање и преживљавање. Наиме, поремећај сигналног пута калцијума у ацинусним ћелијама могући је разлог губитка секреторне функције пљувачних жлезда код Сјогреновог синдрома, као и након зрачне терапије тумора у пределу главе и врата [70], док је на експерименталном моделу за ДМ показано да је губитак хомеостазе калцијума у ацинусним ћелијама удружен са хипосаливацијом у субмандибуларној пљувачној жлезди [71]. Поред очувања сигналног пута калцијума, за нормално стварање пљувачке неопходно је и очување хомеостазе ендотела, важног у одржавању протока крви кроз жлезду. Значајани молекули у том процесу су, пре свега, васкуларни фактор раста порекла ендотела (*vascular endothelial growth factor, VEGF*) и *NO*. *VEGF* посредује у ангиогенези, васкулогенези, повећава пропустљивост крвних судова, делује вазодилататорно и значајан је фактор у преживљавању ендотелних ћелија [72, 73]. Поремећај нивоа *VEGF* у ДМ у ткиву мрежњаче и у бубрежном паренхиму има значајну улогу у настанку ендотелне дисфункције. Експресија гена за *VEGF* индукована је, пре свега, појавом ткивне хипоксије, док његову активност значајно повећава *NO* [73]. Стога поремећај нивоа *VEGF* и *NO* у пљувачним жлездама у ДМ може утицати на смањен проток крви кроз жлезду а тиме и на смањену секрецију пљувачке [74, 75]. Око 50% оболелих од ДМ тип 1 и 2 током живота развије периферну неуропатију у виду сензоримоторне полинеуропатије и/или аутономне неуропатије, при чему обе могу бити

праћене настанком хипосаливације и ксеростомије [56]. Поремећај нивоа неуротрофних фактора уз поремећај њиховог ретроградног транспорта значајни су механизми у патогенези не само неуродегенеративних и психијатријских обољења, већ и у настанку инсулинске резистенције, ДМ и његових компликација [76]. Неуротрофни фактори значајни у настанку периферне неуропатије у ДМ су неуротрофини (нервни фактор раста, неуротрофни мождани фактор, неуротрофини 3,4 и 5), трансформишући фактори раста *β* пореклом глијалних ћелија (*GDNF*, неуртурин, артемин), инсулину слични фактори раста (инсулин, инсулину слични фактори раста *I* и *II*) и цилијарни неуротрофни фактор раста из групе хематопоетских цитокина [76]. Смањен ниво неуротрофног можданог фактора у ДМ представља фактор ризика за настанак неуроваскуларних компликација и повезан је са повећаним ризиком за настанак ретинопатије и неуропатије, при чему његова егзогена примена [77], али примена и других неуротрофних фактора, пре свега из групе неуротрофина и глијалних неуротрофних фактора, делује повољно у терапији периферне неуропатије у ДМ [78]. Према нашим сазнањима ниво неуротрофних фактора у пљувачним жлездама у ДМ до сада није испитиван.

Хроничне компликације дијабетеса мелитуса у ткиву зубне пулпе

Зубна пулпа представља везивно ткиво које настаје из денталне папиле процесом епително-мезенхималне интеракције [79]. Пулпно ткиво полази од периодонталног лигамента и кроз апикални форамен улази у централно локализовану радикуларну и круничну зубну комору окружену са свих страна дентином. Састоји се од артериола, капилара и венула, лимфних судова, сензорних мијелинских (А-*σ* и А-*β*) и Ц амијелинских нервних влакана пореклом од тригеминалног неурона, симпатичких нервних влакана која регулишу циркулацију, пост-митотичких одонтобласта, али и од матичних ћелија (преодонтобласта), фибробласта, одбрамбених ћелија (дендритичне, макрофаге, Т лимфоцити), колагених влакана тип *II* и *III*, као и неколагеног матрикса састављеног углавном од гликозаминогликана. Основна функција пулпног ткива је формирање дентина од стране одонтобласта који синтетишу и секретују екстрацелуларни органски матрикс- предентин чијом минерализацијом се формира дентин. Поред тога зубна пулпа има и нутритивну улогу, као и одбрамбену улогу коју испољава кроз антиинфламаторну и неуросензорну реакцију [80].

Од посебне важности је потенцијал пулпног ткива да формира терцијарни дентин на месту деловања одређених терапијских средстава или штетних стимулуса, било механичких, термичких, осмотских или инфективних [81]. Терцијарни дентин се формира процесом реактивне или репаративне дентиногенезе. Реактивна дентиногенеза се базира на повећаној активности већ диферентованих пост-митотичких примарних одонтобласта које стварају атубуларни фибро- или остео-дентин, док репаративна дентиногенеза представља комплекснији процес током којег се формира репараторни тубуларни дентин, најпре, мобилизацијом матичних ћелија на место повреде, а потом и њиховом цитодиференцијацијом у одонтобластима сличне ћелије (нео-одонтобласти) чија активност је неопходна у тежим оштећењима пулпо-дентинског комплекса, као што је формирање дентинског моста у терапијској процедури директног прекривања зубне пулпе биолошким препаратима [82].

Ткиво зубне пулпе, због своје неповољне анатомске локализације и уз слабо развијену колатералну циркулацију [80], поседује ограничен одбрамбени потенцијал због чега је веома осетљиво на деловање штетних стимулуса, као што је хипергликемијом-изазвана хронична инфламација која додатно слаби репараторни одговор пулпног ткива. *Garber et al.* су у испитивањима успешности терапије директног прекривања пулпе установили да у групи пацова са експериментално изазваним ДМ чешће долази до изостанка или до непотпуног формирања дентинског моста уз постојање хроничног запаљења, које вероватно ремети репараторни одговор ткива зубне пулпе [83]. Наиме, равнотежа између инфламације и репараторно-регенеративног одговора је потребна како би се постигло оздрављење. Негативан

утицај хипергликемије на функцију одонтобласта и дентиногенезу, а тиме и на бржу прогресију каријеса, потврђују и друга истраживања, која показују да је код пацова на исхрани богатој шећерима забележена компромитована примарна и секундарна дентиногенеза, као и чешћа појава каријеса уз настанак већих каријесних лезија [84-86]. Компромитована дентиногенеза у ДМ објашњава се измењеном функцијом одонтобласта и смањеном синтезом колагена тип *I*, који чини основу органског матрикса дентина [87]. Такође, показано је да је код дијабетичних пацова волумен коморе зубне пулпне редукован уз смањену експресију молекула значајних у процесу дентиногенезе, као и ћелијског транскрипционог фактора *c-myb*, који у хуманој култури ћелија зубне пулпе регулише процес аутофагије и доприноси преживљавању ћелија у условима хипергликемијом-индукованог оксидативног стреса [88]. *Ilic et al*. су, такође, показали постојање поремећаја нивоа сигналних молекула значајних у дентиногенези, у виду повишене концентрације коштаног морфогенетског протеина 2 (*bone morphogenetic proteins 2, BMP-2*) и *VEGF* у интактној хуманој пулпи оболелих од ДМ [89]. Повишен ниво *BMP-2* доводи се у везу са настанком микро- и макро-васкуларних компликација у ДМ и формирањем патолошких калцификација [72], чија је већа учесталост, у виду пулполита (каменчићи у ткиву зубне пулпе), који знатно отежавају ендодонтску терапију, показана и у ткиву дијабетичне пулпе [90, 91]. У студији *Amatyakul et al*. показан је смањен проток крви у пулпи дијабетичних пацова [92], вероватно услед постојање ангиопатије [90].

Патифизиолошки механизми укључени у настанак хроничних компликација дијабетеса мелитуса

Хипергликемија

Глукоза представља важан енергетски молекул који се у физиолошким условима метаболише гликолитичким или пентозним путем, док се вишак глукозе депонује у виду гликогена или масних киселина. Гликолитичким путем добијају се никотинамид аденин динуклеотид, аденозин-трифосфат и пирувати који се у аеробним условима даље користе за добијање аденозин-трифосфата или се у анаеробним условима преводе у лактате, док се пентозним путем стварају никотинамид аденин динуклеотидфосфат и рибозе који се користе за синтезу масти, дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) и рибонуклеинске киселине (РНК) [93]. У условима инсулинске резистенције и/или инсулинске инсуфицијенције транспорт глукозе у ћелије инсулин зависних ткива је компромитован, те долази до појаве интраћелијске хипогликемије, која даје сигнал за покретање процеса глукогенезе и глуконеогенезе [94], док интраћелијска хипергликемија настаје у ћелијама које не поседују механизме ауторегулације транспорта глукозе, те стога не могу да обаве нисходну регулацију транспорта глукозе у условима екстраћелијске хипергликемије, која је последица, пре свега, смањеног транспорта глукозе у инсулин зависна ткива, али и повећаног стварања ендогене глукозе. Диферентоване и прогениторне ендотелне ћелије, за разлику од васкуларних глатких мишићних ћелија, не поседују механизме ауторегулације транспорта глукозе због чега су веома подложне оштећењу изазваном хроничном интраћелијском хипергликемијом са последичном дисфункцијом ендотела која се налази у основи васкуларних компликација дијабетеса [43, 95]. Интраћелијска хипергликемија одговорна је за настанак микроваскуларних компликација, док је у генези макроваскуларних компликација укључена екстраћелијска хипергликемија, која је праћена оксидацијом масних киселина [96]. Патогенетски механизми којима интраћелијска хипергликемија доводи до оштећења ткива и настанка хроничних компликација у ДМ су:

1) активација полиолног пута,

2) повећано стварање интраћелијских крајњих (одмаклих) продуката гликозилације (*advanced glycation end products, AGEs*),

3) повећана експресија *AGEs* рецептора,

4) активација протеин киназе Ц (*PKC*), и

5) разградња глукозе кроз хексозамински пут [97].

Сматра се да је интраћелијском хипергликемијом-индуковано појачано стварање супероксидних анјона (O_2^-) у митохондријском транспортном ланцу електрона уз смањену активност глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназе основни иницијатор активације поменутих механизама [98, 99]. ***Активацијом полиолног пута*** фаворизује се стварање и накупљање сорбитола, фруктозе и никотинамид аденин динуклеотида уз смањење нивоа никотинамид аденин динуклеотидфосфата, значајног кофактора у регенерацији глутатиона. Сорбитол је веома хидрофилан молекул који не пролази ћелијску мембрану, те доводи до осмотског шока ћелије који представља основни патогенетски механизам настанка акутне катаракте у ДМ [100]. Повећан ниво никотинамид аденин динуклеотида утиче на појаву оксидативног стреса и инхибицију нормалног метаболизма глукозе, док фруктоза и њени метаболити имају већи потенцијал од глукозе у стварању *AGEs*. У физиолошким условима полиолни пут је минимално активан, док се у условима интраћелијске хипергликемије чак око 30% глукозе метаболише овим путем, стога полиолни пут представља важан извор оксидативног стреса у дијабетесу [101, 102]. ***AGEs*** настају у току гликозилације екстра- и интра-ћелијских протеина, укључујући и нуклеинске киселине, као и гликозилацијом фосфолипида. Укључени су у настанак атеросклеротичних промена. Настали продукти могу да модификују интраћелијске протеине, између осталог и оне укључене у регулацију транскрипције гена [103], или да интерагују са екстраћелијским матриксом [104] или пак да модификују циркулишуће протеине који када се вежу за *AGEs* рецепторе доводе до стварања оксидативног стреса, проинфламаторних цитокина и фактора раста укључених у настанак васкулопатија [105]. ***Активација PKC*** доводи до задебљања базалне мембране капилара, до стварања проинфламаторних цитокина, повећане пропустљивости крвних судова и пролиферације васкуларних ћелија, активације фосфолипазе А2 и смањења активности натријум-калијум аденозин трифосфатазе [106], као и до повећања нивоа вазоконстриктора ендотелина-1 и смањења нивоа ендотелне азот-моноксид синтазе (*eNOS*) чиме се ремети нормалан проток крви у ткиву [107, 108]. ***Активација пута синтезе хексозамина*** има за последицу стварање Н-ацетил глукозамина који, путем гликозилације, врше постранслацијску модификацију интраћелијских протеина, укључујући и факторе транскрипције [109, 110]. Тако гликозилација *eNOS* помоћу Н-ацетил глукозамина у условима хипергликемије инхибира хистамином индуковану *NO*-посредовану вазодилатацију артериола скелетних мишића [111].

<u>Оксидативно-нитрозативни стрес</u>

Оксидативно-нитрозативни стрес настаје када антиоксидативни механизми заштите нису у стању да се изборе са штетним деловањем слободних радикала, било услед њиховог појачаног стварања и/или услед смањеног антиоксидативног капацитета ћелије. Слободни радикали представљају нестабилне хемијски реактивне, краткоткотрајне (10^{-6} секунди) и неселективне молекуле, атоме или јоне који теже постизању стабилног стања кроз предају неспареног електрона или екстракцијом електрона од суседних молекула, који на тај начин постају слободни радикали чиме се покреће ланчана реакција стварања слободних радикала [112]. Слободни радикали настају у ензимским или ненензимским реакцијама, као нормални продукти физиолошких реакција у организму при чему у малим концентрацијама имају улогу сигналних молекула који, регулацијом активности одређених ензима и регулацијом експресије гена, посредују у различитим биолошким функцијама ћелија [113]. Међутим, слободни радикали могу настати и деловањем различитих штетних стимулуса када се стварају у знатно већој концентрацији при којој доводе до оштећења свих ћелијских макромолекула, као што су масти, угљени хидрати, протеини, укључујући ДНК и РНК, такође, ремете апоптозу,

метаболичке процесе у ћелији и експресију гена што за последицу има губитак биолошких функција ћелије и њену смрт [114]. Слободни радикали могу бити кисеонични и азотни. У најважније кисеоничне слободне радикале спадају супероксидни анјон (O_2^-), хидроксилни радикал (*OH*), пероксил (RO_2) и хидропероксил (HRO_2^-), док су најзначајнији азотни слободни радикали *NO* и азот-диоксид (NO_2^-). У значајне прооксидативне нерадикалске кисеоничне и азотне молекуле спадају водоник пероксид (H_2O_2), озон, хипохлорна киселина (*HOCl*), пероксинитрит ($ONOO^-$), нитрозни оксид (HNO_2) и алкил пероксинитрит (*RONOO*) [115]. Супероксидни анјон и *NO* су веома реактивни слободни радикали који врло брзо могу да доведу до стварања великих количина нових слободних радикала. *NO* је један од најпроучаванијих молекула у организму. Синтетише се у готово свим ћелијама, али примарно у ендотелним ћелијама [116]. У физиолошким условима, у nM концентрацијама, *NO*, као ефекторни и сигнални молекул, испољава значајне биолошке ефекте кроз аутокрино и паракрино дејство. Има важну улогу у одржавању васкуларне хомеостазе и сматра се васкулопротективним молекулом јер активацијом цикличног гуанозин монофосфат-зависног пута у глатким васкуларним мишићним ћелијама доводи до њихове релаксације и последичне ендотелно-зависне вазодилатације, антиатерогено дејство испољава спречавајући адхезију тромбоцита и леукоцита за ендотел крвних судова, учествује у ангиогенези и посредује активност *VEGF*, учествује и у централној и периферној неуротрансмисији, као и у одбрани од микроорганизама и секрецији хормона. Настаје активношћу ензима азот-моноксид синтазе (*NOS*) која преводи Л-аргинин у *NO* и Л-цитрулин. Постоје три изоформе *NOS*, неурална (*nNOS*, тип 1) и ендотелна (*eNOS*, тип 3) које су присутне као конститутивни ензими, и индуцибилна (*iNOS*, тип 2) која је први пут идентификована у макрофагама, међутим, може се стварати у готово свим ћелијама у организму [117]. За нормалну активност *NOS* и продукцију *NO* неопходно је присуство пет кофактора, флавин адениндинуклеотида, флавин мононуклеотида, ХЕМ, калцијум-калмодулина и тетрахидробиоптерина [118]. Л-аргинин се синтетише у организму од цитрулина и уноси се храном. Служи као прекурсор у синтези не само *NO* већ и урее, поли-амина, креатин-фосфата и протеина. Ензими аргиназа и *NOS* користе Л-аргинин као заједнички супстрат, те аргиназа, смањујући интраћелијски ниво Л-аргинина, може утицати и на смањено стварање *NO* [119]. Очување интегритета и функције ендотела крвних судова неопходан је предуслов за спречавање формирања атерогених плакова и за одржавање нормалног протока крви у ткиву. Функција ендотелног слоја зависи, пре свега, од нивоа *NO*, те губитак функције *eNOS*, уз компензаторно повећање нивоа и активности *iNOS*, представља основни патогнетски механизам у оштећењу ендотела и настанку васкулопатија. Активност *iNOS* је десетинама пута већа од активности *eNOS*, и када се једном активира *iNOS* остаје активан сатима [117]. Појачано стварање *NO* има кључну улогу у настанку ендотелне дисфункције у ДМ. Патолошко хронично повећање синтезе *NO* у ендотелним ћелијама доводи до стварања пероксинитрита који настају у реакцији *NO* и супероксидног анјона [120, 121]. Пероксинитрит је веома цитотоксичан и снажан оксиданс који модулира функцију протеина, одговоран је за липидну пероксидацију, оштећење ДНК, смањује биоискористљивост *NO* и доводи до оксидације тетрахидробиоптерина [122]. Супероксидни анјон се, такође, ствара у физиолошким условима као продукт метаболичких процеса, пре свега у митохондријама у којима се до 5% молекуларног кисеоника преводи у супероксидни анјон, који се, затим, реакцијом спонтане дизмутације, преводи у H_2O_2. Дизмутацијом супероксидног анјона спречава се пероксидација липида и смањује се стварање пероксинитрита. Реакција између супероксидног анјона и *NO* три пута је бржа од реакције дизмутације супероксидног анјона. H_2O_2, за разлику од супероксидног анјона, лако пролази кроз ћелијску мембрану и остварује удаљене интеракције. H_2O_2 се, антиоксидативним ензимима, конвертује у воду и кисеоник, у супротном H_2O_2, у присуству Fe^{2+}, прелази у врло реактиван хидроксилни радикал који интерагује са скоро свим ћелијским молекулима и оштећује их [123, 124].

Штетном деловању слободних радикала супротстављају се механизми антиоксидативне заштите. У антиоксидативној заштити учествују антиоксидативни ензими

(супероксид дизмутаза, каталаза, глутатион пероксидаза, глутатион редуктаза), али и различите неензимске компоненте у које спадају глутатион (директно неутралише слободне радикале или служи као косупстрат за глутатион пероксидазу), мелатонин, коензим Q_{10} (уклања створени O_2^-, поправља функцију ендотела), витамини А, Е, Ц (повећава стварање *NO*), Б1, Б2, Б6 и Б12, *α*-липоинска киселина (регенерише витамине Ц и Е, и глутатион), селен, бакар, цинк, каротеноиди, фолна киселина, трансферин, феритин, лактоферин и сијалинска киселина. Супероксид дизмутаза (*superoxide dismutase, SOD*) је значајан антиоксидативни ензим у спречавању оксидативног стреса. Својом активношћу катализује реакцију дизмутације супероксидног анјона преводећи га у H_2O_2 ($O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$). *SOD* се јавља у три изоформе, цитоплазматска *Cu/Zn- SOD* (*SOD*1), митохондријска *Mn-SOD* (*SOD*2) и екстрацелуларна *Cu/Zn-SOD* (*SOD*3). *SOD*2 се налази у митохондријама скоро свих ћелија и, с обзиром на локализацију, сматра се првом линије одбране од оксидативног оштећења [124]. Каталаза у лизозомима или глутатион пероксидаза у митохондријама преводе H_2O_2 у молекул воде и кисеоника, док глутатион редуктаза учествује у регенерацији редукованог глутатиона који служи као донор водоника током уклањања H_2O_2 [123].

Оксидативно-нитразативни стрес, поред тога што се налази у основи епигенетичких промена које прате старење, значајан је патогенетски механизам и у настанку великог броја обољења, међу којима су ДМ и хроничне компликације ДМ, неуродегенеративна обољења, пародонтопатија, орални карциноми, као и поремећај функције пљувачних жлезда [125]. Описано је више различитих извора оксидативно-нитрозативног стрес у ДМ. У неензимске изворе стварања слободних радикала спадају митохондријски транспортни ланац електрона, аутооксидација глукозе, реакција глукозе са протеинима уз настанак *AGEs* и активација полиолног пута, док у ензимске изворе спадају никотинамид аденин динуклеотидфосфат оксидаза, некуплована *NOS*, липооксигеназа, циклооксигеназа (*cyclooxygenase, COX*), цитохром *P*450 и ксантин оксидаза [115]. Најзначајнији прооксидативни молекули у настанку хроничних компликација ДМ су супероксидни анјон, *NO* и пероксинитрит. Хипергликемијом-изазвано појачано стварање супероксидног анјона у митохондријском транспортном ланцу електрона сматра се иницијалним догађајем у настанку хроничних компликација ДМ [98], јер је показано да нормализација нивоа супероксидног анјона у митохондријама спречава хипергликемијом-индуковану активацију *PKC*, стварање *AGEs*, акумулацију сорбитола и активацију једарног фактора за појачавање капа лаког ланца активираних Б ћелија (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-κB*) [126]. *NF-κB* представља плејотропни транскрипциони фактор који регулише процесе инфламације, имунолошког одговора, пролиферације и апоптозе [127]. У свом неактивном стању везан је за инхибитор *IκB* и налази се у цитоплазми ћелије. Након деградације *IκB* под утицајем различитих сигналних молекула, као што су слободни радикали, лиганди *AGEs* рецептора, *NO*, ендотоксини и *PKC*, долази до транслокације *NF-κB* фактора у једро и активације *NF-κB* каскаде. Активиран *NF-κB* повећава експресију велике фамилије проинфламаторних гена, укључујући гене за *COX-2, iNOS*, фактор некрозе тумора *α* (*tumor necrosis factor alpha, TNFα*) и интерлеукине (*IL*), *IL*-1*β* и *IL*-6 [128]. Додатни извори генерисања супероксидног анјона у ДМ су аутоксидација глукозе, никотинамид аденин динуклеоид фосфат оксидаза, ксантин оксидаза, *COX* и *NOS* [112].

Присуство оксидативно-нитрозативног стреса изазваног хипергликемијом показано је и у оралним ткивима. Наиме, оксидативни стрес у пљувачним жлездама у ДМ ремети хомеостазу митохондрија и ендоплазматичног ретикулума, органела значајних за очување сигналног пута калцијума у ацинусним ћелијама, кључног у стварању и секрецији пљувачке [66, 114, 129]. Дисфункција митохондрија уз поремећај митофагије, цитопротективног процеса који се активира у циљу уклањања оштећених митохондрија, значајан је патогенетски механизам у оштећењу ткива у ДМ. Оштећење митохондрија у виду смањеног мембранског потенцијала митохондрија и смањеног садржаја аденозин трифосфата у митохондријама за 50%, уз активацију процеса митофагије забележено је у ткиву дијабетичне субмандибуларне пљувачне жлезде мишева, као и када се епителне ћелије субмандибуларне пљувачне жлезде

пацова (СМГ-Ц6) изложе хипергликемији. *Xiang et al.* су у истој студији показали да претретман СМГ-Ц6 антиоксидансом, Н-ацетилцистеином, значајно смањује оштећење митохондрија и условима хипергликемије, што указује да је хипергликемијом-индукован оксидативни стрес директно повезан са оштећењем митохондрија у пљувачним жлездама у ДМ [66]. Такође, на анималном моделу пацова за инсулинску резистенцију поремећај функције субмандибуларне и паротидне пљувачне жлезде праћен је оксидативним стресом [114], док у другој студији на истом анималном моделу показано је постојање дисфункције митохондрија, повећана експресија маркера инфламације и фиброзе, уз поремећај интраћелијског сигналног пута калцијума у ацинусним ћелијама субмандибуларне пљувачне жлезде, међутим, описане промене су биле без утицаја на проток стимулисане пљувачке [130]. Истраживања су показала да је паротидна пљувачна жлезда подложнија настанку већег оксидативног стреса у односу на субмандибуларну, вероватно услед мањег антиоксидативног капацитета паротидне пљувачне жлезде, као и услед израженије липидне вакуолизације ацинусних ћелија и присуства адипоцита [114, 131-133], који у условима инсулинске резистенције и ДМ одржавају хроничну инфламацију ниског интензитета, тако што ослобађају проинфламаторне цитокине и привлаче моноците чијом се трансформацијом у макрофаге додатно продубљују инфламација и оксидативни стрес [134]. До оштећења жлезданог епитела може доћи и услед повећаног нивоа слободних масних киселина у крви, јер када се хумане епителне ћелије паротидне и субмандибуларне пљувачне жлезде, у *in vitro* условима, изложе дејству слободних масних киселина долази до њихове апоптозе и ослобађања *IL*-6, чије је присуство у пљувачним жлездама повезано са одржавањем хроничне инфламације [135]. Оксидативно-нитрозативни стрес у виду дисбаланса у стварању *NO* и повећаног стварања супроксидног анјона утиче неповољно и на проток крви у ткиву и представља важан патогенетски механизам у настанку ендотелне дисфункције која се налази у основи васкулопатија у ДМ [125]. У том смислу, *Roganovic et al.* су показали на артерији паротидне пљувачне жлезде зечева са претходно индукованим ДМ тип 1 постојање ендотелне дисфункције која се манифестује значајно смањеним вазодилататорним ефектом *Ach*, вероватно, услед поремећаја у стварању *NO* који је праћен повећаном експресијом *iNOS* у ендотелу, а не због поремећаја на нивоу мускаринских рецептора испитиваног крвног суда [75]. Такође, и у студији на пацовима са експериментално изазваним ДМ показано је да је проток крви у субмандибуларној пљувачној жлезди измењен, у смислу смањеног вазодилататорног ефекта парасимпатикуса, и да је то, пре свега, последица дисфункције ендотела [42, 136]. У ткиву зубне пулпе у ДМ, такође, је забележен дисбаланс у активности антиоксидативних ензима. Наиме, смањена активност ензима *SOD*, каталазе и глутатион пероксидазе показана је у дијабетичној пулпи пацова [137], док је у другој студији показана појачана активност каталазе уз непромењену активност глутатион пероксидазе и значајно смањен ниво сијалинске киселине која испољава антиоксидативну улогу кроз редукцију H_2O_2 [137]. Чешћа појава патолошких калцификација у зубној пулпи код пацијената са ДМ и на експерименталном моделу ДМ, као и повећан ниво проинфламаторних молекула у ткиву зубне пулпе на анималном моделу ДМ тип 2 доводи се у везу са појачаним стварањем *AGEs* у условима хипергликемије [138, 139]. У условима *in vitro* хипергликемије и оксидативног стреса забележени су и функционални поремећаји хуманих ћелија зубне пулпе у виду компромитоване аутофагије уз смањено преживљавање ћелија, као и смањен ниво молекула укључених у процес дентиногенезе [88]. Стога витална терапија пулпног ткива, која има за циљ очување функције зубне пулпе, код пацијената са дијабетесом може захтевати додатне антиоксидативне терапијске мере које би исход виталних терапијских процедура учиниле извеснијим [140].

Епигенетичке промене и хипергликемијска меморија

Епигенетичке промене се дефинишу као стабилне, барем митотски наследне, али реверзибилне промене у експресији гена настале услед метаболичког дисбаланса и неповољног утицаја спољашњег окружења [141]. Експресија гена се мења не због измена у секвенцама гена, већ због промена у хромозому које могу настати путем три основна епигенетичка механизма:

1) посттранслацијска модификација хистона, која се дешава, најчешће, путем ацетилације/деацетилације, метилације/деметилације и фосфорилације хистона, али и путем гликозилације, убиквитинизације, сумоилације и поли-*ADP*-рибозилације;

2) метилација ДНК;

3) и путем утицаја функционалних некодирајућих РНК, посебно микро-РНК [142, 143].

Сваки од поменутих епигенетичких механизама може деловати индивидуално на експресију гена, међутим, чешће међусобно су зависни и представљају динамичан и врло сложен процес који укључује синергистичко просторно ремоделовање нуклеозома, везивање транскрипционих фактора, елонгацију РНК-полимеразе и активност некодирајућих РНК [144]. Епигенетички механизми регулишу експресију гена на нивоу транскрипције или транслације [145].

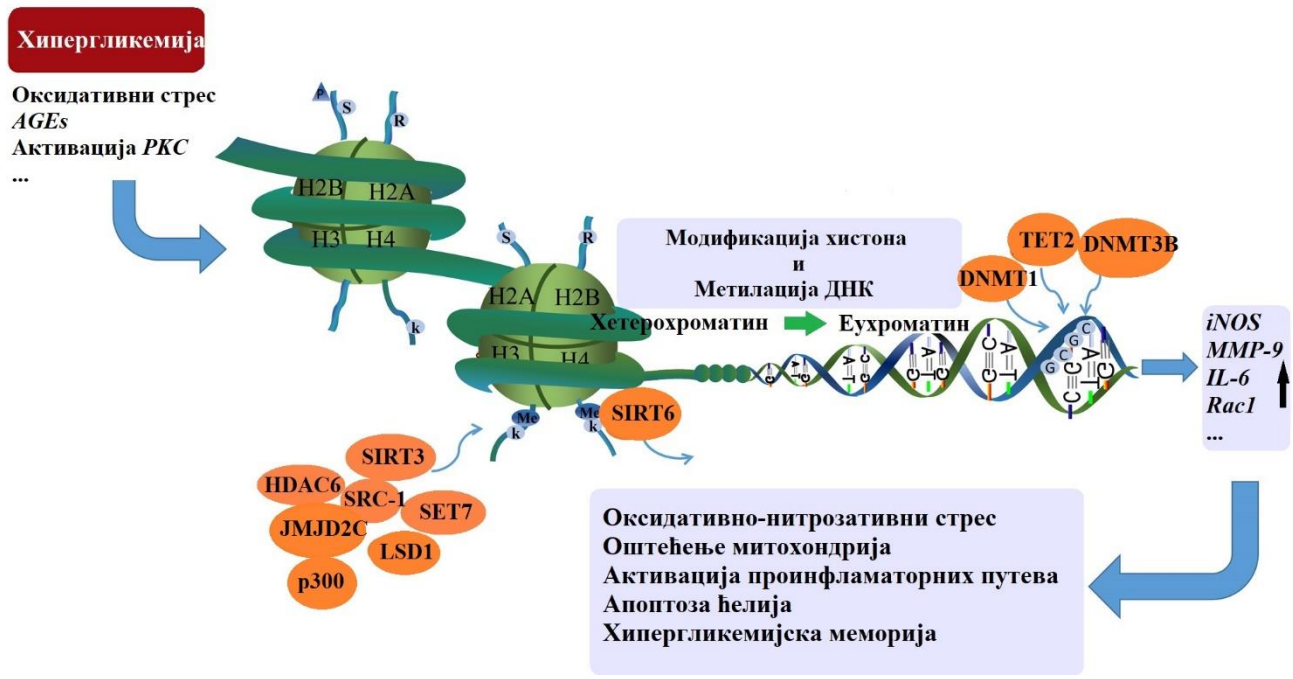
Посттранслацијска модификација хистона представља динамичан процес којим се мења степен кондензације хроматина, односно хроматин се одржава у активном некондензованом (еухроматин) стању, чиме ДНК бива доступна транскрипционим факторима, или се пак хроматин преводи у пасивно кондензовано стање (хетерохроматин), када ДНК постаје недоступна транскрипционим факторима. Нуклеозом представља основну јединицу грађе хроматина и представља ДНК обмотану око комплекса од 8 хистона, *H2A*, *H2B*, *H3* и *H4*, који се понављају два пута и чине језгро нуклеозома, док се помоћу везујућих *H1* и *H5* хистона стабилизује веза између ДНК и језгра нуклеозома и приближавањем нуклеозома врши додатно паковање ДНК. Оваквим начином просторне организације ДНК омогућено је њено смештање унутар једра које је 50 хиљада пута мањих димензија од молекула ДНК. Амино-киселине које улазе у састав хистона могу бити модификоване различитим механизмима. Показано је да ацетилација и фосфорилација хистона дозвољавају транскрипцију ДНК, док је метилација дозвољава или спречава [144]. У модификацији хистона учествују ензими који доводе до настанка или уклањања настале промене, као што су хистон ацетилтрансферазе (*histone acetyltransferases, HATs*) и хистон деацетилазе (*histone deacetylases, HDATs*), које врше ацетилацију и деацетилацију хистона. Ацетилацијом лизин губи своје позитивно наелектрисање чиме се смањује јачина електростатичке везе између хистона и негативно нелектрисаног молекула ДНК, што дозвољава одмотавање ДНК и превођење хроматина у активно стање доступно транскрипционим факторима. Поред просторног ремоделовања нуклеозома, постранслацијска модификација хистона, мењајући хемијске карактеристике хистона, може контролисати експресију гена и кроз измене у привлачењу и везивању одређених транскрипционих фактора и других регулаторних протеина за хроматин.

Метилација ДНК се односи на метилацију цитозина у цитозин-гуанинин динуклеотидима раздвојених фосфатом (*CpG*), при чему је око 3% укупне ДНК физиолошки метиловано. Када су *CpG* динуклиотиди груписани означавају се као *CpG* острва од којих се 50% налази у промотору гена. 80% *CpG* динуклеотида изван ових острва је метиловано, док метилација *CpG* динуклеотида у острвима није заступљена или је минимално заступљена. Чак око 60% гена има *CpG* острва у свом промотору, што значи да њихова транскрипција може бити регулисана кроз метилацију *CpG* острва. Метилацију врше ензими ДНК-метилтрансферазе, при чему метилација ДНК доводи до утишавања гена, док смањена

активност ДНК-метилтрансфераза доводи до појачане експресије гена. Механизми којима метилација ДНК утиче на експресију гена су различити. Један од описаних механизама који доводи до утишавања гена односи се на везивање метил-цитозин везујућих протеина за претходно метиловану ДНК, који потом регрутују друге протеине, као што су *HDATs* које врше деацетилацију и кондензацију хроматина и супримирају транскрипцију гена.

Некодирајуће РНК су функционалне РНК које се не преводе у протеин. Према дужини молекула деле се на мале, са до 200 нуклеотида у саставу, од којих су најзначајније микро-РНК и мале интерферирајуће РНК, и на велике некодирајуће РНК, са преко 200 нуклеотида у саставу. Механизми којима некодирајуће РНК утичу на експресију гена укључују деградацију информационе РНК или инхибицију њене транслације, као и метилацију/деметилацију ДНК и модификацију хистона [145].

Како свака ћелија у основи има исту ДНК, фенотип ћелије одређен је прецизном квантитативном контролом експресије, не свих, већ тачно одређених гена, што указује на улогу епигенетичке контроле експресије гена у диференцијацији ћелија [146]. Осим учешћа у развоју организма, све је више података о кључном значају епигенетичких промена у настанку различитих обољења [147], између осталог, и у прогресији хроничних компликација ДМ. Наиме, интензивном контролом гликемије код пацијената са ДМ тип 1 и 2 развој хроничних компликација је само успорен, али не и спречен [148, 149]. Прогресивно оштећење ткива у ДМ, и у условима нормогликемије, објашњава се постојањем хипергликемијске (метаболичке) меморије. Прва студија која је указала на постојање овог феномена и на значај ране контроле хипергликемије спроведена је 1987. године на дијабетичним псима. У овој петогодишњој студији, показано је да се код паса код којих је добра контрола болести успостављена након две и по године трајања неконтролисане хипергликемије, настанак дијабетичне ретинопатије није могао избећи, али не и код паса код којих је контрола гликемије успостављена након два месеца изложеношћу хипергликемији [150]. Хипергликемијска меморија подразумева појачану експресију проинфламаторних, профиброзних и проапоптотских гена, која перзистира и након успостављања нормогликемије. Претпоставља се да се у основи хипергликемијске меморије налазе епигенетичке промене индуковане оксидативним стресом (Слика 1) [151-153]. Постојање хипергликемијске меморије показано је и у студијама на хуманим ендотелним ћелијама и на ендотелним ћелијама мишева, код којих транзиторна хипергликемија стимулише ензим метилтрансферазу која индукује перзистентну метилацију хистона *H3K4* у промотору *NF-κB p*65 гена чиме је експресија *p*65 субјединице и одређених проатерогених гена, чију експресију регулише ова субјединица, повећана и шестог дана од успостављања нормогликемије [151]. Такође, у глатким васкуларним мишићним ћелијама, изолованих од пацова са ДМ тип 2, показана је појачана експресија проинфламаторних гена, и након неколико пасажа ћелија гајених у нормогликемији. Механизам којим се објашњавају настале промене укључује смањен ниво метилације *H3K9* у промотору испитиваних проинфламаторних гена, као и смањен ниво ензима хистон-метилтранферазе, који катализује ову метилацију, указујући на губитак репресије у експресији проинфламаторних гена [154]. Стога настале епигенетичке модификације хистона имају значајну улогу у настанку и прогресији васкулопатија у ДМ. Због реверзибилности епигенетичких промена, отворене су могућности за увођење епигенетичке терапије хроничних компликација ДМ [155].



Слика 1. Епигенетички механизми укључени у настанак хроничних васкуларних компликација дијабетеса мелитуса [153]. Преузето и модификовано са: *https://jme.bioscientifica.com/view/journals/jme/63/4/JME-19-0170.xml*. *AGEs* – крајњи (одмакли) продукти гликозилације; *PKC* – протеин киназе Ц; *SIRT3* – никотинамид-аденин-динуклеотид зависна деацетилаза сиртуин 3; *HDAC6* – хистон деацетилаза 6; *SRC-1* – коактиватор стероидних рецептора 1; *SET7* – хистон-лизин Н-метилтрансфераза 7; *JMJD2C* – јумојни домен који садржи протеин 2Ц (лизин-специфична деметилаза 4Ц); *LSD1* – лизин-специфична деметилаза 1А; *p300* – хистон ацетилтрансфераза п300; *DNMT1* – ДНК-метилтрансфераза 1; *TET2* – тет метилцитозин диоксигеназа 2; *DNMT3B* – ДНК-метилтрансфераза 3 *β*; *iNOS* – индуцибилна азот-моноксид синтаза; *MMP-9* – матриксна металопротеиназа 9; *IL-6* – интерлеукин 6; *Rac1 – Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*.

Мелатонин и орална ткива

Н-ацетил-5-метокситриптамин или мелатонин (МЕЛ) први је изоловао и описао, 1958. године, амерички професор Аарон Лернер [156]. Назив је добио по улози откривеној још 1917. године, а то је да екскрет говеђе епифизе посветљава кожу код неких риба, гмизаваца и водоземаца [157, 158]. Према хемијској структури МЕЛ спада у индоламине [159]. У живом свету се појавио са појавом првих аеробних организама и са појавом оксидативног стреса, пре око три милијарде година [160]. Задржао се у истом структурном облику све до данас, како код најпростијих једноћелијских организама, тако и код биљака, бескичмењака и кичмењака [161]. Имајући у виду тренутак у ком се МЕЛ појавио у живом свету, његова првобитна улога везује се за антиоксидативну одбрану [162, 163], док је касније, током еволуције, стекао и друге значајне функције, као што су регулација биолошког ритма [164, 165], антиинфламаторна и имуномодулаторна улога [166, 167], регулација метаболизма коштаног ткива [168, 169] и метаболичких процеса [170]. Показана је и антиканцерогена улога МЕЛ, коју остварује делујући, пре свега, проапоптотски и антипролиферативно према туморским ћелијама [171]. Новија истраживања баве се, испитивањем улоге МЕЛ и у неурогенези и фармакотерапији анксиозности и депресије [172]. Имајући у виду различите физиолошке улоге МЕЛ, поремећај његовог нивоа и сигнализације повезан је са многим стањима и обољењима у организму, као што су старење, Алцхајмерова и Паркинсонова болест,

поремећаји спавања и расположења, метаболички поремећаји, појава катаракте и епилепсија [173, 174].

Првобитно описано место синтезе МЕЛ је у пинеалоцитима епифизе. Епифиза је неуроендокрина жлезда смештена на граници између средњег мозга и међумозга [175, 176]. Синтеза МЕЛ у епифизи је под контролом симпатичке инервације и *NA*, који као примарни ћелијски гласник, преко, пре свега, β_1 адренергичких рецептора, повећава експресију и активност ензима који синтетишу МЕЛ [176, 177]. Сигнал и предуслов за синтезу МЕЛ у епифизи представља одсуство светлости, и обрнуто, синтеза МЕЛ у епифизи је инхибирана у присуству светлости. Прекурсор у синтетисању МЕЛ је есенцијална амино киселина триптофан, коју пинеалоцити преузимају из крви и каскадом ензимских реакција преводе у МЕЛ. Најпре се триптофан хидролизује, потом се реакцијом декарбоксилације преводи у серотонин, који се ацетилује посредством ензима сератонин Н-ацетил трансферазе, и у завршном кораку, метилацијом, коју катализује ензим хидрокси-индол-О-метил-трансфераза, конвертује у МЕЛ [165]. С обзиром да МЕЛ, као амфифилан молекул, лако пролази све ћелијске мембране и баријере, укључујући и крвно-мождану [178] и плаценталну баријеру [179], након што се синтетише у пинеалоцитима, не складишти се у епифизи, већ се одмах, пасивном дифузијом, ослобађа у крвоток и цереброспиналну течност [178]. Концентрација МЕЛ у крвној плазми показује циркадијалне осцилације које су у складу са циркадијалним ритмом лучења МЕЛ у епифизи. Највећа концентрација МЕЛ у крвној плазми постиже се ноћу, чак и код животиња које су активне ноћу, као што су глодари [180]. Код људи се концентрација МЕЛ у циркулацији ноћу креће до 100-170 pg/ml, док током дана значајно опада, и највише износи око 10-20 pg/ml [206]. У погледу концентрације МЕЛ у крвној плазми постоје велике интериндивидуалне разлике које су условљене наследном предиспозицијом, старошћу и присуством одређених обољења [181]. Из крвне плазме МЕЛ се дистрибуира у сва ткива, при чему је степен дистрибуције МЕЛ из крви у периферна ткива условљен количином везаног МЕЛ за протеине плазме, као и афинитетом МЕЛ за одређено ткиво [182]. Иако МЕЛ са лакоћом пролази биолошке мембране, постоје специфични механизми који регулишу субцелуларну дистрибуцију МЕЛ, која се показала неуниформном када се пореде концентрације МЕЛ у различитим сегментима ћелије, при чему је највећа концентрација МЕЛ забележена у митохондријама [183].

Осим епифизе, и друга периферна ткива и ћелије имају способност локалне синтезе МЕЛ, при чему је МЕЛ у појединим ткивима нађен у значајно већој концентрацији него у епифизи и крвној плазми. МЕЛ се синтетише у ћелијама имуног система, у лимфоцитима и макрофагама, у ткиву мрежњаче, у респираторном епителу, у мозгу, кожи, репродуктивним органима, гастроинтестиналном тракту (ГИТ), тимусу, коштаној сржи и пљувачним жлездама [183]. Митохондрије представљају главно место синтезе МЕЛ у периферним ткивима, при чему концентрација МЕЛ у митохондријама превазилази концентрацију МЕЛ у крвној плазми [184, 185]. Екстрапинална места синтезе МЕЛ у веома малој мери представљају извор циркулишућег МЕЛ, са изузетком ГИТ [186]. Локално синтетисан МЕЛ испољава углавном антиоксидативно дејство [159], али поседује и друге биолошке функције које остварује као аутокоид и/или паракоид, те се МЕЛ дефинише, не само као неурохормон, већ и као убиквитаран молекул са плејотропним ефектима [187]. У прилог овој тврдњи говори аутомитокрини ефекат МЕЛ у нервним ћелијама, који подразумева ослобађање МЕЛ синтетисаног у митохондријама у цитоплазму нервне ћелије и његово везивање за мелатонинске рецепторе (МТР) на митохондријама, преко којих, затим, МЕЛ регулише функцију митохондрија и остварује неуропротективну улогу [188].

Циркулишући и локално синтетисан МЕЛ своје биолошке ефекте остварује на два начина, делујући преко таргет протина (рецептора, ензима, транспортера и других протеина) или независно од њих, испољавајући тренутно или одложено дејство [189]. Као таргет протеини МЕЛ највише су испитани МТР. До сада су описана два типа МТР код људи, MT_1P

са геном на 4. хромозому (Мел 1а или МТНР1А) и $МТ_2Р$ са геном на 11. хромозому (Мел 1б или МТНР1Б). МТР припадају групи трансмембранских рецептора везаних за хетеротримерни Г протеин [190]. Присуство МТР показано је у различитим ткивима и органима. Секундарни интраћелијски гласници укључени у трансдукцију мелатонинског сигнала су циклични аденозин-монофосфат, циклични гуанозин-монофосфат или IP_3 који покрећу одговарајући, ткивно и ћелијски специфичан, интраћелијски одговор [191, 192]. Неке од функција које МЕЛ остварује преко рецептора су регулација спавања, периферна вазоконстрикција, стимулација антиоксидативних ензима, инхибиција прооксидативних и проинфламаторних ензима, модулација процеса митофагије и аутофагије. Дејство које МЕЛ остварује без посредовања МТР односи се на директно неутралисање кисеоничних и нитрозативних слободних радикала, при чему је показана способност МЕЛ да директно неутралише супероксидни анјон, OH, H_2O_2, NO и пероксинитрит. За разлику од класичних антиоксиданаса који имају капацитет да неутралишу један или два слободна радикала, забележена је способност једног молекула МЕЛ да неутралише и до десет молекула слободних радикала, захваљујући настанку интермедијарних једињења која такође имају способност неутралисања слободних радикала, при чему се МЕЛ не понаша даље као оксиданс за разлику од витамина Ц и Е, и глутатиона, већ настају стабилни продукти који се излучују путем урина [193].

Метаболисање МЕЛ је доста сложен и још недовољно познат процес. МЕЛ се може метаболисати на три начина, неензимским или ензимским путем и у реакцији са слободним радикалима. Метаболисањем МЕЛ настају биолошки активни продукати, који своје ефекте испољавају преко МТР или независно од рецептора. Стога и продукте метаболизма МЕЛ треба узети у обзир када се говори о његовим крајњим ефектима [194]. МЕЛ се метаболише или локално, у ткиву у којем се синтетише, или у јетри, где се метаболише и до 90% МЕЛ из крвне плазме. Због израженог метаболизма МЕЛ у јетри, биоискористљивост МЕЛ након оралне примене је врло мала и износи од 3% до 33%, уз постојање великих интериндивидуалних варијација у биоискористљивости МЕЛ [195]. Најважнији ензими у метаболисању МЕЛ су из групе цитохрома *P*450 (CYP_1A_2 и CYP_2C_{19}), нарочито у јетри, али и у другим ткивима. Основни пут метаболисања МЕЛ је индолни пут, који се одвија путем цитохрома *P*450 [196]. Којим путем ће се МЕЛ метаболисати зависи од врсте ткива и тренутних потреба у ткиву [197].

Присуство МЕЛ показано је и у усној дупљи, као и његова улога у очувању оралне хомеостазе. Порекло МЕЛ у пљувачки објашњава се, пре свега, фракицијом невезаног МЕЛ из крвне плазме који, процесом пасивне дифузије путем пљувачних жлезда, доспева у пљувачку. Међутим, у анималним и хуманим студијама, присуство ензима који учествују у синтези МЕЛ, у дукталним, али не и у ацинусним ћелијама пљувачних жлезда, као и у оралној слузокожи језика, указује и на локалну синтезу МЕЛ у изводним каналима пљувачних жлезда и у оралној слузокожи [198]. Осим тога, постојање мелатонинских секреторнх гранула и везикула, у ацинусним и дукталним ћелијама, указује на способност пљувачних жлезда да депонују МЕЛ. Како у ацинусним ћелијама нису нађени ензими неопходни за синтезу МЕЛ, МЕЛ депонован у ацинусним ћелијама је стога највероватније пореклом из крвне плазме а не МЕЛ синтетисан у жлезди, те пасивна дифузија није једини пут којим МЕЛ доспева преко пљувачних жлезда у пљувачку, већ егзоцитоза секреторних гранула представља још један пут. Мелатонинске секреторне грануле су два пута заступљеније у хуманој паротидној пљувачној жлезди него у субмандибуларној [199]. Концентрација МЕЛ у пљувачки, као и у крвној плазми, подложна је циркадијалним осцилацијама, што је очекивано када се има у виду да пљувачка представља ултрафилтрат крвне плазме. Стога МЕЛ пик у концентрацији достиже ноћу и креће се у распону од 10 до 65 pg/ml, док дању концентрација МЕЛ у пљувачки износи до 10 pg/ml. У тренутку мерења концентрације МЕЛ у пљувачки, концентрација МЕЛ у крвној плазми може се предвидети поуздано само када је његова концентрација у крви већа од 60 pg/ml. Тада концентрација МЕЛ у пљувачки износи 36±3% од концентрације МЕЛ у крвној плазми. Однос концентрације МЕЛ у пљувачки и крвној плазми на нивоу 24 часа износи 0,33 [200]. Концентрација МЕЛ у пљувачки зависи од количине везаног МЕЛ за протеине крвне плазме,

јер само слободна фракција МЕЛ доспева у пљувачку [200, 201], али и од протока пљувачке и од присуства инфламаторних обољења у усној дупљи. У том смислу показано је да концентрација МЕЛ у пљувачки и сулкусној течности, у којој је такође детектован, значајно опада како инфламаторна болест пародонталних ткива напредује од гингивитиса ка пародонтопатији [202, 203]. Присуство МТР у пљувачним жлездама, у ацинусним и у дукталним ћелијама указује на могућу улогу МЕЛ у секрецији пљувачке. Иако су у питању трансмембрански рецептори присутни су и у цитоплазми, нарочито у оним деловима ацинусне ћелије у којима се депонује МЕЛ [204], што наводи на претпоставку да су МТР укључени у процес транспорта и депоновања МЕЛ у пљувачним жлездама [199]. Ефекат МЕЛ на секрецију пљувачке није у потпуности испитан. У паротидној пљувачној жлезди пацова показано је да егзогена примена МЕЛ повећава секрецију протеина за 25%, делујући преко МТР. Одговор секреторних ћелија на стимулацију МЕЛ је скоро у потпуности посредован активношћу *NO* пореклом *nNOS*, локализоване вероватно у паренхимским а не у нервним ћелијама. Претпоставља се да ендогени МЕЛ гастроинтестиналног порекла утиче на секрецију протеина у пљувачним жлездама на исти начин као и гастрин и холецистокинин. Наиме, тек након оброка, када долази до повећане синтезе МЕЛ у ГИТ, постиже се довољна концентрација МЕЛ у крви која може да доведе до повећане синтезе протеина у пљувачним жлездама. Утицај МЕЛ на секрецију флуида није показан [205, 206]. Присуство MT_1P у заметку зуба и у околним одонтобластима у неонаталној мандибули указује на потенцијалну улогу МЕЛ у усклађивању раста зуба са растом вилица [207]. Такође, код мишева, губитак циркадијалног ритма спавања, у виду сталне изложености светлу или мраку, утиче на пре- и пост-натални развој глеђи у виду њеног одложеног стварања, уз настанак вакуолизације и некрозе амелобласта и поремећај процеса минерализације глеђи [208].

У оралним ткивима показана је антиинфламаторна, антимикробна, остеоиндуктивна и антитуморска улога МЕЛ [209, 210]. Примена МЕЛ може имати значаја у терапији локалних инфламаторних улцерација оралне слузокоже, као и у бржем зарастању постекстракционих рана. Осим тога, локална апликација МЕЛ у постекстракциону алвеолу смањује оксидативни стрес у крвној плазми након вађења зуба [211]. У патогенези оралног карцинома показана је антитуморска улога МЕЛ. Наиме, смањена експресија MT_1P у хуманој оралној мукози код оралног планоцелуларног карцинома, услед генских (мутација и делеција) и/или епегентичких (хиперметилација) промена у гену за MT_1P, удружена је са већим степеном преживљавања и пролиферативним потенцијалом карциномских ћелија [212]. МЕЛ такође епигенетичким механизмом смањује експресију и активност матриксне металопротеиназе 9 чиме инхибира миграцију ћелија оралног карцинома [213]. Показана је и радиопротективна улога МЕЛ у спречавању мукозитиса језика, изазваног зрачењем, при чему се у поређењу са системском применом, локална апликација МЕЛ, у виду 3% гела, показала ефикаснијом. Механизми којима МЕЛ спречава настанак оралног мукозитиса након зрачне терапије код пацова укључују инхибицију активације *NF-κB* проинфламаторног сигналног пута и очување хомеостазе митохондрија [214]. Улога МЕЛ у метаболизму коштаног ткива у виду стимулације диференцијације остеобласта и синтезе протеина коштаног матрикса са једне стране, и инхибиције остеокласта са друге стране, показала се корисном приликом осеоинтеграције денталних имплантата, која може бити побољшана захваљујући, не само остеоиндуктивном дејству МЕЛ, већ захваљујући и његовом антиоксидативном и антиинфламаторном дејству, чиме МЕЛ инхибира ресорпцију алвеоларне кости, изазвану хируршком интервенцијом уградње имплантата. Наиме, показано је да локална и системска примена МЕЛ на експерименталним моделима и у клиничким условима, стимулише осеоинтеграцију имплантата [215, 216], доприноси мањем губитку кресталне кости, као и већој стабилности имплантата код раног оптерећења [217]. Истраживања указују и на улогу МЕЛ у одржавању хомеостазе пародонталних ткива [209, 218]. У *in vitro* студији на ћелијској линији мишјих макрофага, показано је да примена МЕЛ у присуству липополисахарида пореклом од бактерије *Prevotella intermedia*, значајне у настанку инфламације пародонталних ткива, снажно

супримира стварање прооксидативних и проинфламаторних молекула, *NO* и *IL*-6 [219]. У клиничким истраживањима и на анималном моделу за пародонтопатију, такође, је указано на повољан антиинфламаторни и антиоксидативни ефекат локалне и системске примене МЕЛ у терапији пародонтопатије [220-222]. Елиминацијом оксидативног стреса и инфламације, МЕЛ модулира активност *RANK*/*RANKL*/*OPG* тријаде, кључне у губитку алвеоларног коштаног ткива, и смањује ресорпцију алвеоларне кости у пародонтопатији. Локална гингивална примена МЕЛ код пацијената са пародонтопатијом смањује ниво остеокластогеног фактора *RANKL* (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RANKL*) у пљувачки и повећава ниво протективног молекула остеопротежерина (*Osteoprotegerin, OPG*), који инхибира стимулативни ефекат *RANKL* на остеокласте [220]. Ефекат МЕЛ на процес дентиногенезе, показан је на култури ћелија денталне папиле пацова, где примена МЕЛ супримира пролиферацију ћелија денталне папиле, док у остеогеном медијуму стимулише њихову диференцијацију. Наведени *in vitro* ефекти МЕЛ вероватно укључују регулацију активности *I* и *IV* комплекса митохондрија, јер су присутни и када су МТР блокирани [223]. Исти ефекти физиолошких концентрација МЕЛ показани су и у мешовитој хуманој култури ћелија зубне пулпе, састављеној од имунокомпететних и недиферентованих мезенхималних матичних ћелија, чија пролиферација је инхибирана у присуству МЕЛ, док је експресија маркера одонтобластне диференцијације стимулисана, што упућује на могућу улогу МЕЛ у минерализацији терцијарног дентина [224]. У испитивању ефикасности примене МЕЛ у процедури директног прекривања пулпе на експерименталном моделу показано је да нема значајне разлике између ефикасности МЕЛ (75%) и минерал триоксид-агрегата (87,5%) у погледу формирања дентинског моста [225]. Међутим, додатна истраживања су потребна како би се испитала тачна улога и механизми деловања МЕЛ у развоју и расту зуба и у процесу терцијарне дентиногенезе.

Мелатонин и дијабетес мелитус

Имајући у виду да се у основи хроничних компликација дијабетеса налази оксидативно-нитрозативни стрес и хронична инфламација, примена антиоксидантних и антиинфламаторних молекула може повољно деловати на ток ДМ. У том смислу, испитује се могућност примене МЕЛ у превенцији и терапији хроничних компликација ДМ. Сазнањем да је ниво МЕЛ у ДМ смањен, вероватно услед повећане директне деградације МЕЛ слободним радикалима и смањене активности ензима који учествују у његовој синтези, отвара се и питање суплементатције МЕЛ оболелих од ДМ [226-228]. МЕЛ своју антиоксидативну улогу остварује директно, неутрализацијом слободних радикала [229] и индиректно супресијом прооксидативних ензима, *iNOS, COX-2*, мијелопероксидазе и еозинофилне пероксидазе [230, 231], као и стимулацијом антиоксидативних ензима, глутатион пероксидазе и редуктазе, *SOD* и каталазе [123] и синтезом глутатиона [232]. На анималним моделима за ДМ показано је да системна примена МЕЛ смањује ниво оксидативно-нитризативног стреса тако што код дијабетичних зечева повећава активност глутатион редуктазе у јетри и бубрезима и повећава активност глутатион пероксидазе у јетри [233]. Код дијабетичних пацова учествује у одржавању активности ретиналне каталазе [234] и инхибицијом *NF-κB* каскаде снижава ниво проинфламторних молекула (*IL*-1*β, TNFα, iNOS*), док стимулиацијом PI_3K/*AKT-Nrf*2 сигналног пута МЕЛ повећава синтезу глутаминске цистеинске лигазе, важног ензима у синтези глутатиона, чиме делује повољно у спречавању оштећења мрежњаче у условима инфламације и оксидативног стреса [235]. Фактор 2 повезан са нуклеарним фактором-еритроидом 2 (*nuclear factor erythroid* 2-*related factor* 2, *Nrf*2) је транскрипциони фактор који у условима оксидативног стреса стимулише експресију антиоксидативних ензима и доприноси антиоксидативној заштити [236]. Такође, парентерална примена МЕЛ код дијабетичних пацова испољава неуропротективно дејство, тако што стимулацијом *Nrf*2 каскаде и инхибицијом *NF-κB* каскаде повећава ниво хем-оксигеназе 1, ензима са антиоксидативном улогом, и смањује ниво проинфламаторних молекула (*TNFα, IL*-6, *iNOS, COX-2*) у

ишијадичном нерву [237]. Показано је и да МЕЛ доприноси очувању хомеостазе митохондрија у кардиомиоцитима [238] и у нервним ћелијама, тако што стимулацијом процеса митофагије, као хомеостатског механизма, омогућава уклањање хипергликемијом оштећених митохондрија [239], док код пацова третираних алоксаном и стрептозоцином, МЕЛ испољава заштитни антиоксидативни ефекат према *β* ћелијама панкреаса [240, 241]. Антиинфламаторно дејство и стимулацију антиоксидативних ензима МЕЛ остварује, између осталог, механизмима епигенетичке модулације [242]. О епигенетичкој улози МЕЛ у регулацији инфламације, сугеришу и резултати студије *Deng et al*. који су показали да МЕЛ, у ћелијској линији макрофага третираних проинфламаторним медијатором, у фармаколошкој концентрацији од 1 mM, смањујући експресију *NOS2* и *COX-2* гена, као и ниво протеина *iNOS* и *COX-2* испољава антиинфламаторни ефекат, механизмом који укључује инхибицију активности *p300* чиме је супримирана ацетилација *NF-κB p*52 субјединице и њено везивање за ДНК у регији промотора *NOS2* и *COX-2* гена [243]. Клиничка испитивања показују да суплементација МЕЛ редукује параметре ДМ у виду смањења вредности гликемије наште, вредност гликозилираног хемоглобина и инсулинску резистенцију [244]. Повољан ефекат примене МЕЛ у условима ДМ забележен је и у оралним ткивима. Наиме, употреба МЕЛ у локалној терапији хроничне пародонтопатије код оболелих од ДМ значајно снижава ниво саливарних маркера ресорпције алвеоларне кости (алкалне и киселе фосфатазе, остеопонтина и *RANKL*) и повећава ниво протективног молекула *OPG*, што је праћено побољшањем клиничких параметра болести, укључујући смањење гингивалног индекса инфламације и смањену дубину пародонталног џепа. Елиминација инфламације у пародонталним ткивима и успостављање пародонталне хомеостазе доприноси и бољој регулацији гликемије [220]. Међутим, до сада нису спроведена истраживања о молекуларним механизмима дејства МЕЛ у паротидној пљувачној жлезди и зубној пулпи у ДМ тип 2.

ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Радна хипотеза

Ниво експресије протеина МЕЛ, *iNOS* и *GDNF* и активност *SOD* у хуманом ткиву паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе разликују се између здравих испитаника и испитаника са ДМ тип 2. МЕЛ *in vitro* у фармаколошким концентрацијама, смањујући оксидативно-нитрозативни стрес и инфламацију, испољава цитопротективни ефекат према хуманим ћелијама паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе у условима ДМ тип 2 и хипергликемије.

Циљеви истраживања

Имајући у виду значајну антиоксидативну и антиинфламаторну улогу МЕЛ и улогу МЕЛ као епигенетичког модулатора, као и да у научној литератури нема података о концентрацији МЕЛ и молекуларним механизмима дејства МЕЛ у паротидној пљувачној жлезди и зубној пулпи у ДМ тип 2, дефинисани су следећи циљеви:

1. одредити и упоредити експресију протеина МЕЛ, *iNOS* и *GDNF* и активност *SOD* у хуманом ткиву паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе у групи здравих испитаника и у групи испитаника са ДМ тип 2;

2. испитати ефекте фармаколошких концентрација МЕЛ (0,1 mM и 1 mM), *in vitro*, на метаболичку активност и вијабилност хуманих ћелија паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе;

3. испитати ефекте фармаколошких концентрација МЕЛ, *in vitro*, на експресију протеина *iNOS*, *p300* и *GDNF* и на активност *SOD* у културама ћелија паротидне пљувачне жлезде пореклом од здравих испитаника и пореклом од испитаника са ДМ тип 2;

4. испитати ефекте фармаколошких концентрација МЕЛ, *in vitro*, на експресију протеина *iNOS*, *p300* и *GDNF* и на активност *SOD* у хуманим културама ћелија зубне пулпе у условима нормо- и хипер-гликемије.

ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДЕ

Популација испитаника

У истраживање је било укључено 72 испитаника, 64 испитаника за испитивања на ткивима и по четири испитаника за испитивања на културама ћелија паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе. Прикупљање узорака спроведено је на клиникама Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. На Клиници за болести зуба прикупљени су узорци ткива зубне пулпе, док су умњаци за изолацију ћелија зубне пулпе добијени на Клиници за оралну хирургију. На Клиници за максилофацијалну хирургију прикупљени су узорци ткива паротидне пљувачне жлезде. За испитивања на ткивима испитаници су подељени у две групе, контролну групу системски здравих испитаника и групу испитаника са ДМ тип 2, са по 16 испитаника по групи. Потребна величина узорка за снагу студије од 80% (1-β) и критеријум значајности од 0,05 израчуната је на основу рада *Cutando et al*. [245]. За рачунање величине узорка коришћен је *G*Power* 3.0.10 статистички програм. Исечци ткива паротидних пљувачних жлезда за изолацију ћелија добијени су од четири испитаника, два системски здрава испитаника старости од 63 (женског пола) и 60 (мушког пола) година, и два испитаника са ДМ тип 2 и без других системских обољења старости од 61 (мушког пола) и 59 (женског пола) година. Умњаци потребни за изолацију ћелија зубне пулпе добијени су од четири системски здрава испитаника старости од 23 до 26 година.

Критеријуми за укључивање испитаника у студију за прикупљање узорака ткива били су редован сан од 22:00 до 06:00 часова у просторији без вештачког осветљења и за пацијенте са ДМ тип 2 трајање терапије оралним хипогликемицима најмање три године уз ниво гликозилираног хемоглобина <7% [246] .

Критеријуми за искључивање испитаника из студије за прикупљање узорака ткива били су: пушење, дојење, трудноћа, употреба контрацептивних пилула, дијететских суплемената, антибиотика и антиинфламаторних лекова у последњих месец дана, као и употреба било којих других лекова осим за терапију дијабетеса, раније постојање тумора и примена зрачне терапије у пределу главе и врата, као и индекс телесне масе (*Body Mass Index, BMI*) већи од 30 kg/m^2.

Сви испитаници су, након усменог и писменог образложења о значају и току истраживања, потписали писмену сагласност за давање узорака ткива паротидне пљувачне жлезде или зубне пулпе или за давање умњака. Дозволу да се истраживање спроведе дао је Етички комитет Стоматолошког факултета Универзитета у Београду (број уверења 36/2). Са свим испитаницима се поступало према принципима *Добре клиничке праксе*. Докторска дисертација је урађена у оквиру пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја под називом „Контрола бола и молекуларни механизми као фактори регенеративне терапије у стоматологији код здравих пацијената и пацијената са дијабетес мелитусом“, број ОИ175021.

Сакупљање и припрема хуманих узорака ткива паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе

Узорци ткива паротидне пљувачне жлезде добијени су од пацијената примљених због хируршког уклањања бенигних тумора паротидне пљувачне жлезде. Након хируршке процедуре уклањања тумора, добијени су исечци ткива који макроскопски нису показивали знаке обољења. Имајући у виду циркадијални ритам лучења МЕЛ, узорци ткива су сакупљани у преподневним часовима. Узорци су потом транспортовани у Кребс-Рингеровом бикарбонатном хранљивом раствору, у чијем саставу се налазе *NaCl* 118,3 mM, *KCl* 4,7 mM, $CaCl_2$ 2,5 mM, $MgSO_4$ 1,2 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, $NaHCO_3$ 25,0 mM и глукоза 11,1 mM, до

лабораторије где су тренутно смрзавани и чувани у хладњаку на -70°C за потребе будућих експерименталних анализа.

Ткиво зубне пулпе добијено је из интактних зуба, код којих је у току препротетске припреме у циљу успостављана оптималне оклузалне равни или постизања паралелности клиничких круна индикована терапија виталне екстирпације зубне пулпе. Здравље ткива зубне пулпе проверено је клинички помоћу електро-апарата за испитивање виталитета (Југодент, Нови Сад, Србија) и на основу ретроалвеоларних радиографских снимака. Укључени су зуби код којих вредност теста виталитета у односу на контролни зуб није одступала више од један и зуби који на радиографском снимку нису показивали знаке обољења ткива зубне пулпе и пародонцијума. Због циркадијалног ритма лучења МЕЛ узорци ткива су сакупљани увек у преподневним часовима. Узимање узорка и даље лечење зуба спроведено је стандардним поступком од стране специјалисте за болести зуба и ендодонцију. За локалну анестезију коришћен је 3% мепивакаин (*Scandonest 3% Plain, Septodont*, Париз, Француска). Зуб(и) укључени у истраживање дезинфиковани су најпре 70% етанолом (Зорка Фарма, Шабац, Србија), а потом и 0,2% хлорхексидином (*Curasept 220; Curaden International AG,* Криенс, Швајцарска). Након трепанације, комора пулпе је испрана физиолошким раствором након чега је приступљено поступку екстирпације ткива зубне пулпе. Узорци ткива зубне пулпе су тренутно смрзавани у течном азоту и пренесени до лабораторије где су чувани у хладњаку на -70°C.

Даља лабораторијска испитивања на узорцима ткива обављена су *ELISA* (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) методом и спектрофотометријском методом. Узорци ткива паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе су за поменуте анализе припремани на исти начин. Након одмрзавања најпре је измерена и стандардизована тежина ткива (*Adventurer* ^{TM}*, OHAUS, Corp., Pine Brook,* Њујорк, САД). Затим су ткива у циљу екстракције укупних протеина подвргнута поступку мануелне хомогенизације помоћу стакленог штапића уз следствено центрифугирање узорака на 10 000 обртаја/минути у трајању од 10 минута (*Heraeus* Biofuge Primo R, Thermo Fisher Scientific,* Валтам, САД) и издвајање супернатанта. У добијеним супернатантима *ELISA* методом обављена је квантификација протеина МЕЛ, *iNOS* и *GDNF*, док је спектрофотометријском методом одређена активност *SOD*.

Изолација хуманих ћелија паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе

Узорци тива паротидних пљувачних жлезда, одмах након хируршке интервенције уклањања бенигних тумора жлезде, транспортовани су у транспортном медијуму у Лабораторију за изолацију ћелија Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. Хранљиви медијум се састојао од 79% хранљиве подлоге за ћелијске културе (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, low glucose, Sigma-Aldrich*), 20% феталног говеђег серума (*Fetal Bovine Serum-FBS, Sigma-Aldrich*) и 1% антибиотика (*Penicillin-Streptomicin-AB, Sigma-Aldrich*). Након испирања ткива фосфатним пуфером (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline-DPBS, Sigma-Aldrich*) и физичког одстрањивања присутног везивног и масног ткива, за изолацију ћелија коришћени су фрагменати ткива ацинусног изгледа. Ћелије су изоловане методом експланта (*outgrowth*) која подразумева механичко уситњавање ткива паротидне пљувачне жлезде на што ситније делове димензија од 0,5 до 1 mm^3. Уситњено ткиво је потом пребачено у пластичну посуду за гајење ћелија површине од 25 cm^2 (T-25 фласк) уз додавање хранљивог медијума (89% *DMEM,* 10% *FBS,* 1% *AB*).

За изолацију ћелија зубне пулпе коришћени су интактни умњаци са завршеним растом корена, који су након екстракције из ортодонтских разлога испрани физиолошким раствором и транспортовани у Лабораторију за изолацију ћелија, при чему је коришћен исти транспортни медијум као и за паротидне пљувачне жлезде. Након испирања умњака *DPBS* пулпа је

екстирпирана из круничног и коренског дела зуба, при чему су ћелије изоловане претходно описаном методом експланта.

Ћелије паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе гајене су у хранљивом медијуму, у инкубатору под стандардним условима, на температури од 37°C, у влажној атмосфери (95%) и при концентрацији угљен-диоксида од 5%. Хранљиви медијум је мењан на 3 до 4 дана. При конфлуентности ћелија од око 80% ћелије су пасажиране. За одвајање ћелија од подлоге фласка коришћен је *TrypLE™ Express Enzime* (*Life Tehnologie*, Калифорнија, САД) који у основи има рекомбинантни ензим серин протеазу. Дејству *TrypLE™ Express* ћелије су излагане у инкубатору у трајању од 10 минута након чега је његово дејство заустављено додавањем хранљивог медијума (1:4). Ћелије су потом центрифугиране на 1700 обртаја/минути у трајању од 6 минута након чега су *TrypLE™ Express* и хранљиви медијум одливени и ћелије ресуспендоване у одговарајућој количини хранљивог медијума. Потом су ћелије избројане и засејане у фласкове одговарајуће величине. Бројање ћелија и испитивање њиховог степена вијабилности вршено је под светлосним микроскопом применом методе по *Bürker-Türk*-у. Том приликом тестиран је интегритет плазма мембране применом 0,4% раствора боје трипан-плавог (*Trypan Blue, Sigma-Aldrich*). Наиме, само ћелије са оштећеном плазма мембраном усвајају боју и целе се пребојавају у плаво, док код ћелија са интактном плазма мембраном, само се ћелијска мембрана пребојава бојом трипан-плавог. У свим наредним експериментима су коришћене ћелије после треће пасаже, чија је вијабилност износила преко 90%.

In vitro испитивање цитотоксичности фармаколошких концентрација мелатонина на хуманим културама ћелија паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе

У циљу провере безбедности одабраних фармаколошких концентрација МЕЛ (0,1 mM и од 1 mM) за експерименте на културама ћелија најпре су спроведени колориметријски тестови за испитивање цитотоксичност: МТТ тест и тест уноса неутрално црвене боје (*neutral red uptake, NRU*). МТТ тестом одређује се степен метаболичке активности ћелија, јер се МТТ тест заснива на способности метаболички активних ћелија да редукују жуту тетразолијумову со (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich*) до кристала љубичастог формазана уз помоћ, пре свега, ензима никотинамид аденин динуклеотид зависне оксидоредуктазе и дехидрогеназе, који се налазе у митохондријама, али и у ендозомско-лизозомском систему и цитоплазми ћелије [247], док се *NRU* тест заснива на способности живих ћелија са очуваним интегритетом и функцијом плазма мембране да апсорбују боју неутрално црвено (*Neutral Red, Sigma-Aldrich*) и таложе је унутар лизозма, јер само у условима физиолошке *pH* вредности у ћелији боја неутрално црвено може да се инкорпорира у лизозоме [248].

За спровођење МТТ и *NRU* теста формирано је пет група са по шест бунара, само за бланк групу четири бунара:

1. група је формирана као унутрашња контрола цитотоксичности, при чему су ћелије третиране познатим цитотоксичним једињењем, 0,5 % натријум-хипохлоритом- *NaOCl* (*Chloraxid 2%, Cerkamed*, Пољска) или *Triton X-100*,

2. група је представљала негативну контролну групу (ћелије без третмана, само у хранљивом медијуму са додатком етанола у концентрацији од 0,25% као растварача за МЕЛ),

3. група је формирана за третман ћелија МЕЛ у концентрацији од 0,1 mM,

4. група за третман ћелија МЕЛ у концентрацији од 1 mM, и

5. групу су чинили бунари у којима ћелије нису засејане (бланк група).

За растварање МЕЛ (*Melatonine, Sigma-Aldrich*) коришћен је 96% етанол (Зорка Фарма, Шабац, Србија) у финалној концентрацији од 0,25%, за коју је у прелиминарним испитивањима показано да је безбедна за ћелије паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе. После треће пасаже, ћелије су засејане у микротитрациону плочу са 96 радних места. Засејано је по 7500 ћелија/100 µl хранљивог медијума по бунару. Након постизања конфлуентности од 80%, ћелије су третиране МЕЛ. После инкубације ћелија са МЕЛ (24 сата) медијум је одливен и ћелије су испране *DPBS*. У све бунаре је потом додато по 100 µl радног раствора за МТТ (0,5 mg/ml) или за *NRU* (40 µg/ml). Након инкубације од три сата радни раствор је одливен и у бунаре за МТТ тест додато је по 100 µl диметил-сулфоксида (*Dimethyl sulfoxide-DMSO, Sigma-Aldrich*) за растварање кристала формазана, док су за *NRU* тест ћелије прво испране са 150 µl *DPBS* након чега је додато по 150 µl кислеог раствора, 50% етанола са 1% сирћетном киселином (Зорка Фарма, Шабац, Србија), за растварање и ослобађање боје неутрално црвено из лизозома. Како би се поспешило растварање боје микротитрационе плоче су шејковане 20 минута на температури од 37°C и на 250 обртаја/минути, са следственим мерењем апсорбанце раствора. Мерење апсорбанце за оба теста вршено је на *ELISA* читачу (*RT*- 2100*c*, *Rayto*, Кина) на 540 nm таласне дужине. МТТ и *NRU* тест поновљени су најмање два пута за сваког пацијента. Вијабилност ћелија (%) је израчуната на основу формуле:

$$\text{Вијабилност (\%)} = \frac{\text{средња вредност апсорбанце експерименталне групе} - \text{средња вредност апсорбанце бланк групе}}{\text{средња вредност апсорбанце негативне контроле} - \text{средња вредност апсорбанце бланк групе}} \times 100.$$

Начин тумачења резултата тестова дат је у Табели 1.

Табела 1. Тумачење резултата теста редукције тетразола (МТТ) и теста уноса неутрално црвено боје (*NRU*)

Вијабилност ћелија (%)	Степен цитотоксичности МЕЛ
>90%	не испољава цитотоксично дејство
од 60% до 90%	испољава благу цитотоксичност
од 30% до 60%	испољава умерену цитотоксичност
<30%	испољава јаку цитотоксичност

Третман мелатонином хуманих култура ћелија паротидне пљувачне жлезде пореклом од здравих испитаника и пореклом од испитаника са ДМ тип 2

Ћелије паротидне пљувачне жлезде пореклом од здравих испитаника и пореклом од испитаника са ДМ тип 2, након треће пасаже, засејане су у трипликату у плоче са шест бунара. При конфлуентности од 80% ћелије су инкубиране са МЕЛ у концентрацији од 0,1 mM у трајању од 24 сата. Након инкубације ћелија са МЕЛ, хранљиви медијум је одливен, ћелије су одлепљене од подлоге помоћу *TrypLE™ Express*, избројане и сакупљене у *DPBS* у циљу

екстракције укупних ћелијских протеина процедуром наизменичног замрзавања и одмрзавања ћелија. Поступак наизменичног замрзавања и одмрзавања ћелија поновљење три пута у циљу што ефикасније дисрупције мембрана услед наизменичног бубрења и контраховања ћелија приликом формирања кристала и њиховог топљења. Након трећег одмрзавања узорци су центрифугирани на 10 000 обртаја/минути у трајању од пет минута уз следствено сакупљање супернатанта. У добијеним узорцима супернатанта, који су чувано у хладњаку на -70°C, *ELISA* методом квантификоване су концентрације протеина *iNOS, p300* и *GDNF*, док је спектофотометријском методм одређена активност *SOD*.

Третман мелатонином хуманих култура ћелија зубне пулпе у условима *in vitro* нормо- и хипер-гликемије

Хумане културе ћелија зубне пулпе излагане су хипергликемији са циљем да се изазову оксидо-нитрозативни стрес и инфламација, као основни патолошких механизама у настанку хроничних компликација ДМ. Након треће пасаже, ћелије су засејане у дупликату у плоче са шест бунара, у седам група (1. контролна група, ћелије гајене у условима нормогликемије (НГ); 2. НГ+0,1 mM МЕЛ; 3. НГ+1 mM МЕЛ; 4. ћелије гајене у хипергликемији (ХГ); 5. ХГ+0,1 mM; 6. ХГ+1 mM МЕЛ; 7. осмотска контрола хипергликемије). При конфлуентности од 80% ћелије су изложене хипергликемији у трајању од 72 сати, тако што је у хранљиви медијум са физиолошком концентрацијом глукозе (5 mM) додата Д-глукоза (Хемофарм, Вршац, Србија) у укупној концентрацији од 25 mM. Као контролна група служиле су ћелије гајене у условима нормогликемије (5 mM), док је за осмотску контролу хипергликемије коришћен манитол (Хемофарм, Вршац, Србија) у истој концентрацији као и Д-глукоза (25 mM). Хранљиви медијум је мењан на 24 сата. У последњих 24 сата деловања хипергликемије, у одговарајуће експерименталне групе додат је МЕЛ. Након инкубације ћелија са МЕЛ (24 сата), ћелије су механички одлепљене од подлоге и сакупљене у хранљивом медијуму у ком су гајене (1 ml) у циљу екстракције укупних ћелијских протеина. Поступци екстракције ћелијских протеина и чување узорака за даље анализе *ELISA* методом (квантификација протеина *iNOS, p300* и *GDNF*) и спектофотометријском методом (активност *SOD*) спроведени су на исти начин као у експерименту на хуманој култури ћелија паротидне пљувачне жлезде.

Квантификација протеина мелатонина, *iNOS, p300* и *GDNF* имуноензимском *ELISA* методом

„Сендвич“ *ELISA* метододом измерене су концентрације протеина МЕЛ (pg/ml), *iNOS* (ng/ml) и *GDNF* (pg/ml) у ткивима паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе, док су у културама ћелија паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе измерене концентрације протеина *iNOS* (ng/ml), *p300* (ng/ml) и *GDNF* (pg/ml).

ELISA метода се заснива на имунолошкој реакцији антитела и антигена у циљу детекције или квантификације испитиваног антигена, најчешће протеина. У основи „сендвич“ *ELISA* методе је употреба два различита антитела за детекцију испитиваног антигена. Испитивани антиген се, ако је присутан у супернатанту узорка, најпре везује за примарно антитело које се већ налази на дну бунара микротитрационе плоче. После одговарајућег периода инкубације са примарним антителом, испира се супернатант и додаје се секундарно антитело коњуговано са биотином које се везује за антиген и формира се комплекс примарно антитело - испитивани антиген - секундарно антитело коњуговано са биотином. Након што се испере невезано секундарно антитело додаје се ензим који је коњугован са авидином који се везује за биотин на секундарном антителу у комплексу. Након испирања невезаног ензима додаје се одговарајући супстрат, који реагујући са ензимом, боји раствор чија се апсорбанца, потом, очитава помоћу спектрофотометра, на одговарајућој таласној дужини. Боја раствора

зависи од степена заступљености антигена у узорку. За очитавање апсорбанце раствора коришћен је *Multiskan EX* апарат (*Thermo Fisher* Scientific, Волтам, САД). Метода је изведена према протоколу произвођача комерцијалних *ELISA* китова: *Human Melatonin* (*MT*) *ELISA kit, Cusabio Biotech*, Вухан, Кина; *Human Inducible Nitric Oxide Synthase* (*iNOS*) *ELISA Kit, Biopeony,* Пекинг, Кина; *Human Histone Acetyltransferase p300 ELISA* kit, *Wuxi Donglin Sci & Tech Development,* Кина; *Human GDNF ELISA kit, Sigma-Aldrich*.

Одређивање активности *SOD* спектрофотометријском методом

За одређивање активности *SOD* у ткивима и културама ћелија паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе коришћена је спектрофотометријска метода. Спектрофотометријске методе се заснивају на мерењу апсорбанце раствора чија се боја развија у реакцији одговарајућег супстрата и ензима. Наиме, за одређивање активности *SOD* спектрофотометријском методом користи се ензим ксантин-оксидаза која у реакцији превођења ксантина у мокраћну киселину катализује стварање супероксидних анјона. Добијени супероксидни анјони ступају у реакција са мононатријум *WST*-1 тетразолијумовом соли [2-(4-*Iodophenyl*)-3-(4-*nitrophenyl*)-5-(2,4-*disulfophenyl*)-*2H-tetrazolium sodium salt*] и катализују њен прелазак у растворљиве кристале формазана, што се детектује повећањем вредности апсорбанце раствора. Апсорбанца раствора очитана је на таласној дужини од 450 nm помоћу спектрофотрометра- *Multiskan EX* апарат (*Thermo Fisher* Scientific, Волтам, САД). Како *SOD* компетитивно учествује у неутрализацији супероксидних анјона, метода се заснива на мерењу степена инхибиције превођења *WST*-1 тетразолијумове соли у кристале формазана у присуству *SOD*. Испитивање је спроведено према протоколу произвођача комерцијалног кита за испитивање активности *SOD* (*SOD Determination Kit, Sigma-Aldrich*).

Статистичка обрада података

Статистичка обрада података урађена је помоћу СПСС 17.0. статистичког пакета (*SPSS Statistics for Windows, Version* 17.0., *SPSS Inc.*, Чикаго, Илиноис, САД). Нумерички подаци представљени су у виду средњих вредности ± стандардна девијација средње вредности. У зависности од нормалности расподеле нумеричких података, испитиване Колмогоров-Смирновљевим тестом, коришћени су параметарски или непараметарски тестови. Сви експерименти су поновљени најмање два пута. Ниво значајности сматра се за $p<0,05$.

РЕЗУЛТАТИ

Карактеристике испитаника укључених у сакупљање узорака ткива паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе

Између здравих испитаника, који су чинили контролну групу, и испитаника са ДМ тип 2 укључених у прикупљање узорака ткива паротидне пљувачне жлезде (Табела 2) и зубне пулпе (Табела 3), статистички значајна разлика у погледу старости, заступљености броја пушача и броја особа мушког и женског пола, и вредности *BMI*, није забележена (p>0,05). Просечна дужина трајања ДМ тип 2 код испитаника укључених у прикупљање узорака ткива паротидне пљувачне жлезде износила је 6,1±2,8 година (Табела 2) и 9,5±6,5 година код испитаника укључених у прикупљање узорака ткива зубне пулпе (Табела 3).

Табела 2. Карактеристике испитаника укључених у сакупљање узорака ткива паротидне пљувачне жлезде

Карактеристике	Здрави испитаници н=16	Испитаници са ДМ тип 2 н=16	*p*
Жене/мушкарци	8/8	7/9	> 0,05[а]
Старост (године)	59,13 ± 11,61	67,13 ± 9,7	> 0,05[б]
Пушачи (%)	37,5	31,25	> 0,05[а]
BMI (kg/m^2)	23,44 ± 2,83	26,19 ± 3,35	> 0,05[в]
Трајање ДМ тип 2 (године)		6,1 ± 2,8	

Легенда: н- број испитаника; [а]χ^2 тест; [б]Ман-Витнијев тест; [в]Студентов Т тест за независне узорке

Табела 3. Карактеристике испитаника укључених у сакупљање узорака ткива зубне пулпе

Карактеристике	Здрави испитаници н=16	Испитаници са ДМ тип 2 н=16	*p*
Жене/мушкарци	8/8	9/7	> 0,05[а]
Старост (године)	59,1 ± 7,3	61,1 ± 9,1	> 0,05[б]
Пушачи (%)	31,25	31,25	> 0,05[а]
BMI (kg/m^2)	25,3 ± 4,0	27,5 ± 3,5	> 0,05[б]
Трајање ДМ тип 2 (године)		9,5 ± 6,5	

Легенда: н- број испитаника; [а]χ^2 тест; [б]Ман-Витнијев тест

Резултати лабораторијских испитивања на хуманим узорцима ткива и на хуманим културама ћелија паротидне пљувачне жлезде

Концентрације протеина мелатонина, *iNOS* и *GDNF* и активност *SOD* у ткиву паротидне пљувачне жлезде здравих испитаника и испитаника са ДМ тип 2

Резултати испитавања на ткиву паротидне пљувачне жлезде указују на значајно смањену концентрацију протеина МЕЛ у групи испитаника са ДМ тип 2 у односу на контролну групу здравих испитаника ($p<0,01$), док су концентрације *iNOS* и *GDNF* значајно повећане (*iNOS*: $p<0,01$; *GDNF*: $p<0,01$), као и активност *SOD* ($p<0,0001$). Резултати су приказани у Табели 4.

Табела 4. Концентрације протеина мелатонина (МЕЛ), индуцибилне азот-моноксид синтазе (*iNOS*) и неуротрофног фактора пореклом глијалних ћелија (*GDNF*) и активност супероксид дизмутазе (*SOD*) у ткивном супернатанту паротидне пљувачне жлезде у групи здравих испитаника и у групи испитаника са ДМ тип 2

Испитивани молекули	Здрави испитаници н=16	Испитаници са ДМ тип 2 н=16	*p*
МЕЛ (pg/ml)	269,20 ± 44,95	202,30 ± 76,50	< 0,01[а]
iNOS (ng/ml)	0,85 ± 0,36	1,15 ± 0,41	< 0,01[б]
SOD (%)	95,75 ± 2,32	98,18 ± 1,99	< 0,0001[б]
GDNF (pg/ml)	112,0 ± 47,49	186,90 ± 87,09	< 0,01[а]

Легенда: н- број испитаника; [а] Студентов Т тест за независне узорке; [б] Ман-Витнијев тест

Резултати испитивања цитотоксичности фармаколошких концентрација мелатонина на културама ћелија паротидне пљувачне жлезде

У испитивањима цитотоксичности фармаколошких концентрација МЕЛ показано је да МЕЛ у концентрацији од 0,1 mM, након 24 сата од излагања ћелија дејству МЕЛ, није значајно утицао на метаболичку активност и вијабилност ћелија паротидне пљувачне жлезде, испитивано МТТ и *NRU* тестом (МТТ: 100% *vs* 95,3±3,4 %; *NRU*: 100% *vs* 97,65±3,93%). Међутим, након инкубације ћелија са МЕЛ у концентрацији од 1 mM (24 сата), МТТ тестом добијена је смањена метаболичка активност ћелија за скоро 20% (100% *vs* 80,31±4,04%), док је вредност *NRU* теста била у благом порасту, за скоро 8% (100% *vs* 107,67±0,58%) (График 1).

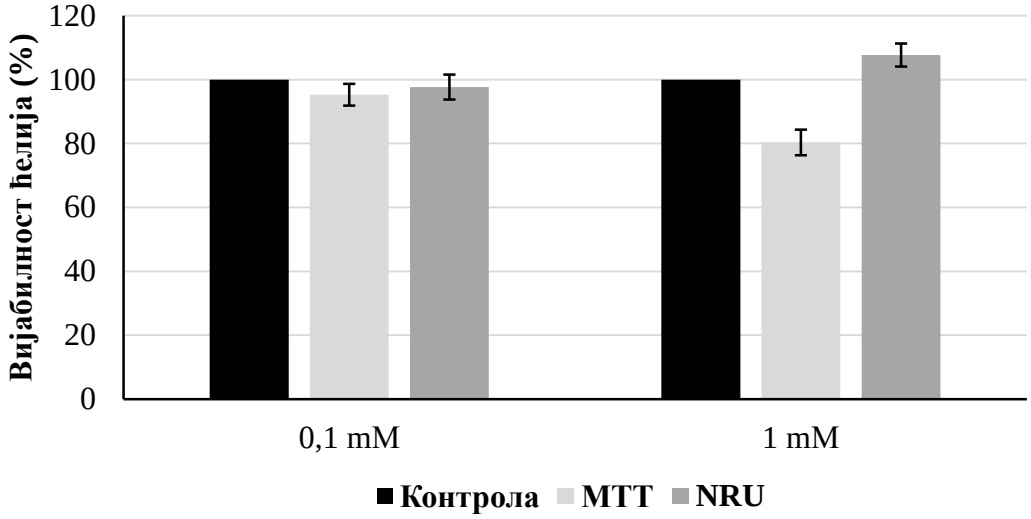


График 1. Метаболичка активност и вијабилност ћелија паротидне пљувачне жлезде након третмана МЕЛ (0,1 mM и 1 mM, 24 сата) испитиване МТТ и *NRU* тестовима. Резултати су представљени као средње вредности ± стандардна девијација средњих вредности за три различита пацијента.

Концентрације протеина *iNOS, p300* и *GDNF* и активност *SOD* у култури ћелија паротидне пљувачне жлезде пореклом од здравих испитаника и пореклом од испитаника са ДМ тип 2

У културма ћелија паротидне пљувачне жлезде пореклом од испитаника са ДМ тип 2 утврђене су значајно повећане концентрације протеина *iNOS*, *p300* и *GDNF* у односу на контролне концентрације измерене у ћелијама пореклом од здравих испитаника (*iNOS*: 0,253±0,02 ng/ml *vs* 0,531±0,02 ng/ml, $p<0,01$, График 2; *p300*: 0,475±0,12 ng/ml *vs* 1,966±0,17 ng/ml, $p<0,05$, График 3; *GDNF*: 13,64±1,44 pg/ml *vs* 29,57±0,99 pg/ml, $p<0,05$, График 4), као и повећана активност *SOD* (20,59±2,49% *vs* 57,84±2,52%, $p<0,001$, График 5).

Концентрације протеина *iNOS, p300* и *GDNF* и активност *SOD* у култури ћелија паротидне пљувачне жлезде пореклом од здравих испитаника након примене мелатонина, *in vitro*

У култури ћелија паротидне пљувачне жлезде пореклом од здравих испитаника показано је да примена МЕЛ (0,1 mM, 24 сата) није значајно утицала на концентрације протеина *iNOS* и *p300*, у поређењу са контролном групом без третмана (*iNOS*: 0,253±0,02 ng/ml *vs* 0,234±0,02 ng/ml, $p>0,05$, График 2; *p300*: 0,475±0,12 *vs* ng/ml 0,436±0,09 ng/ml, $p>0,05$, График 3). Међутим, концентрација *GDNF* је значајно повећана након третмана ћелија МЕЛ (13,64±1,44 pg/ml *vs* 29,85±1,67 pg/ml, $p<0,05$, График 4), као и активност *SOD* (20,59±2,49% *vs* 40,58±2,67%, $p<0,05$, График 5).

Концентрације протеина *iNOS, p300* и *GDNF* и активност *SOD* у култури ћелија паротидне пљувачне жлезде пореклом од испитаника са ДМ тип 2 након примене мелатонина, *in vitro*

У култури ћелија паротидне пљувачне жлезде пореклом од испитаника са ДМ тип 2 третман ћелија МЕЛ (0,1 mM, 24 сата) значајно смањује повећану активност *SOD* (57,84±2,52% *vs* 36,83±2,38%, $p<0,05$, График 5), док концентрације *iNOS*, *p300* и *GDNF* нису значајно промењене ($p>0,05$) након третмана ћелија МЕЛ (*iNOS*: 0,531±0,02 ng/ml *vs* 0,401±0,03 ng/ml, График 2; *p300*: 1,966±0,17 pg/ml *vs* 1,228±0,16 pg/ml, График 3; *GDNF*: 29,57±0,99 pg/ml *vs* 28,48±1,49 pg/ml, График 4).

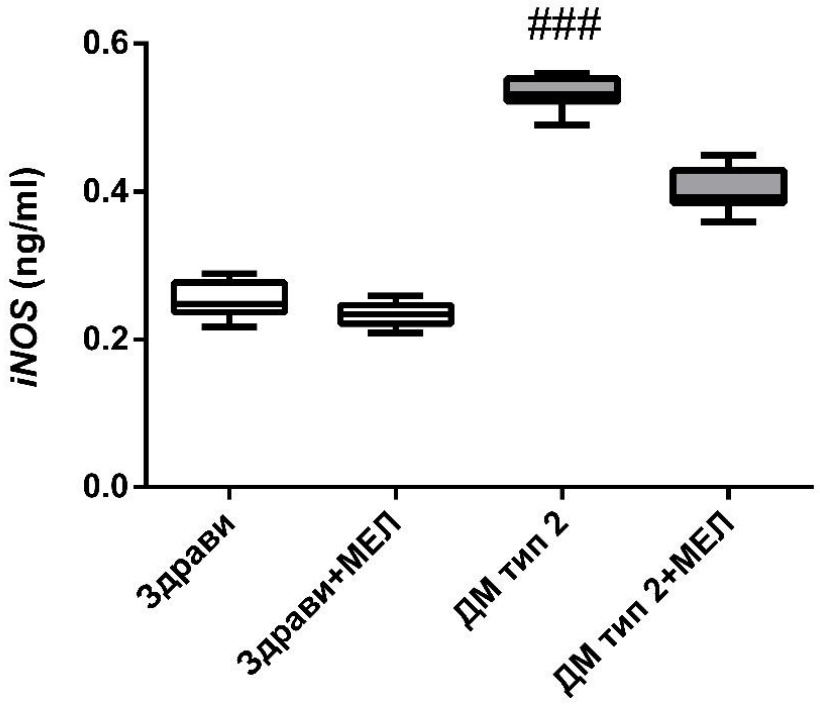


График 2. Концентрација протеина индуцибилне азот-моноксид синтазе (*iNOS*) у култури ћелија паротидне пљувачне жлезде пореклом од два здрава испитаника и пореклом од два испитаника са ДМ тип 2, као и након третмана ћелија мелатонином (МЕЛ) у концентрацији од 0,1 mM (24 сата).

###p<0,001 у поређењу са здравим

Крускал-Валисов тест праћен Данетовим *post hoc* тестом

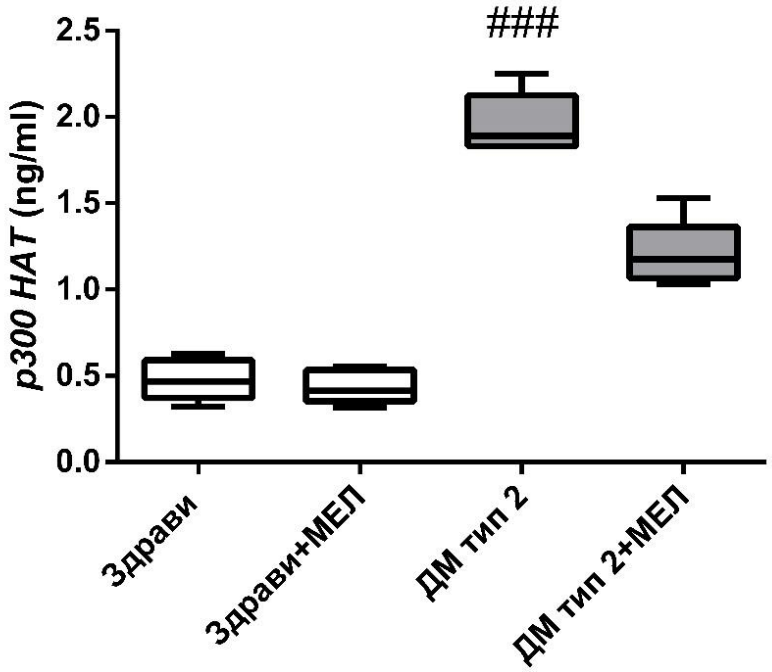


График 3. Концентрација протеина хистон ацетилтрансферазе п300 (*p300*) у култури ћелија паротидне пљувачние жлезде пореклом од два здрава испитаника и пореклом од два испитаника са ДМ тип 2, као и након третмана ћелија мелатонином (МЕЛ) у концентрацији од 0,1 mM (24 сата).

###$p<0{,}001$ у поређењу са здравим

Крускал-Валисов тест праћен Данетовим *post hoc* тестом

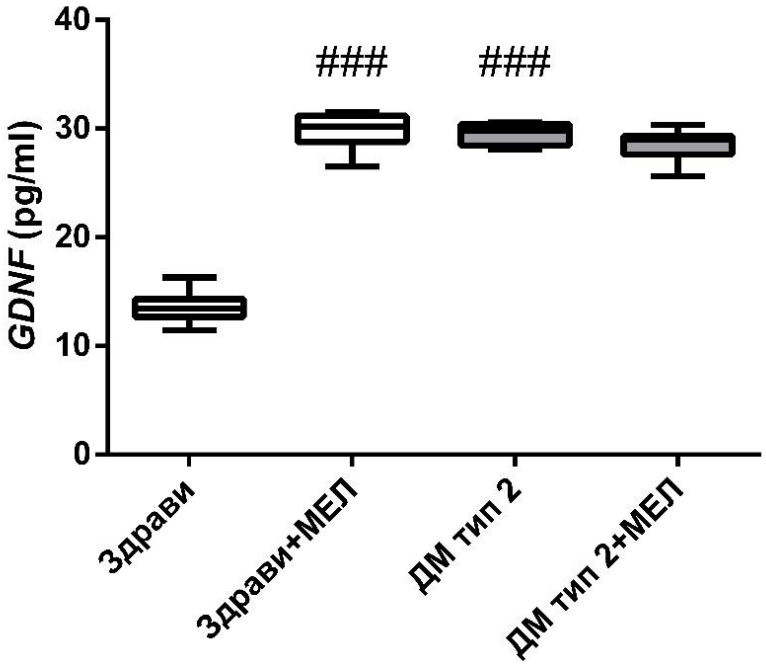


График 4. Концентрација протеина неуротрофног фактора пореклом глијалних ћелија (*GDNF*) у култури ћелија паротидне пљувачне жлезде пореклом од два здрава испитаника и пореклом од два испитаника са ДМ тип 2, као и након третмана ћелија мелатонином (МЕЛ) у концентрацији од 0,1 mM (24 сата).

###$p<0{,}001$ у поређењу са здравим

Крускал-Валисов тест праћен Данетовим *post hoc* тестом

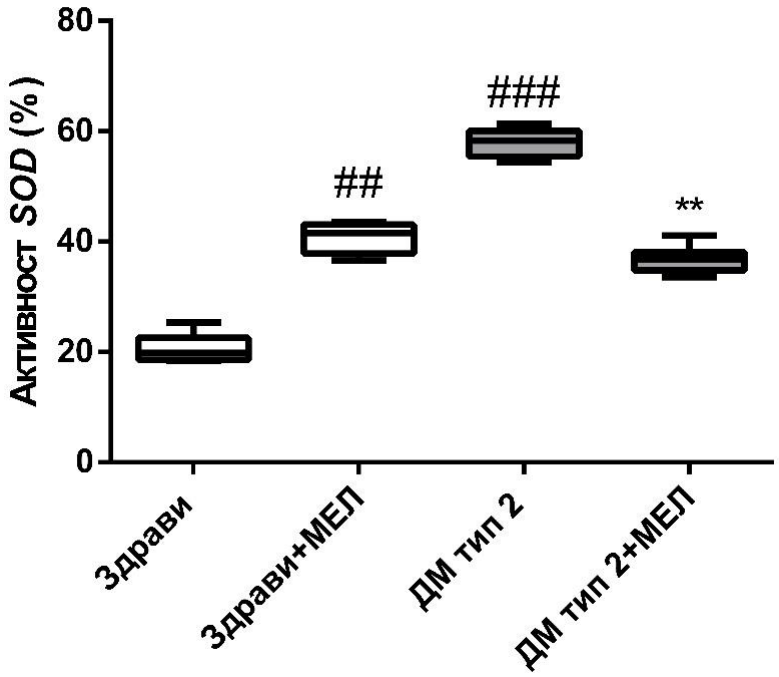


График 5. Активност супероксид дизмутазе (*SOD*) у култури ћелија паротидне пљувачне жлезде пореклом од два здрава испитаника и пореклом од два испитаника са ДМ тип 2, као и након третмана ћелија мелатонином (МЕЛ) у концентрацији од 0,1 mM (24 сата).

##$p<0{,}01$ и ###$p<0{,}001$ у поређењу са здравим, **$p<0{,}01$ у поређењу са ДМ тип 2

Крускал-Валисов тест праћен Данетовим *post hoc* тестом

Резултати лабораторијских испитивања на хуманим узорцима ткива зубне пулпе и на хуманим културама ћелија зубне пулпе

Концентрације протеина мелатонина, *iNOS* и *GDNF* и активност *SOD* у ткиву зубне пулпе здравих испитаника и испитаника са ДМ тип 2

У испитивањима на ткивима зубне пулпе утврђена је значајно смањена концентрација протеина МЕЛ у групи испитаника са ДМ тип 2 у односу на контролну групу здравих испитаника ($p<0,001$), док је концентрација протеина *iNOS* значајно повећана ($p<0,001$), као и концентрација протеина *GDNF* ($p<0,05$). Са друге стране значајна разлика у активности *SOD* у групи испитаника са ДМ тип 2 није покзана, иако је уочена тенденција смањења активности *SOD* ($p=0,07$). Резултати испитивања на ткивима зубне пулпе приказани су у Табели 5.

Табела 5. Концентрација протеина мелатонина (МЕЛ), индуцибилне азот-моноксид синтазе (*iNOS*) и нуротрофног фактора пореклом глијалних ћелија (*GDNF*) и активност супероксид дизмутазе (*SOD*) у ткивном супернатанту зубне пулпе у групи здравих испитаника и у групи испитаника са ДМ тип 2

Испитивани молекули	Здрави испитаници н=16	Испитаници са ДМ тип 2 н=16	*p*
МЕЛ (pg/ml)	240,0 ± 19,10	124,30 ± 21,60	< 0,001
iNOS (ng/ml)	0,32 ± 0,09	0,92 ± 0,08	< 0,001
SOD (%)	98,6 ± 0,50	97,5 ± 0,40	0,070
GDNF (pg/ml)	0,24 ± 0,11	0,34 ± 0,17	< 0,05

Легенда: н- број испитаника; Студентов Т тест за независне узорке

Резултати испитивања цитотоксичности фармаколошких концентрација мелатонина на културама ћелија зубне пулпе

Након испитивања цитотоксичности фармаколошких концентрација МЕЛ од 0,1 mM и 1 mM (24 сата) на ћелијама зубне пулпе показано је да обе концентрације МЕЛ нису значајно утицале на метаболичку активност ћелија испитивану МТТ тестом (0,1 mM: 100% *vs* 96,55±3,5 % и 1 mM: 100% *vs* 94,7±3,9%), као и на вијабилност ћелија испитивану *NRU* тестом (0,1 mM: 100% *vs* 99,45±4,1% и 1 mM: 100% *vs* 98,38±4,3%) (График 6).

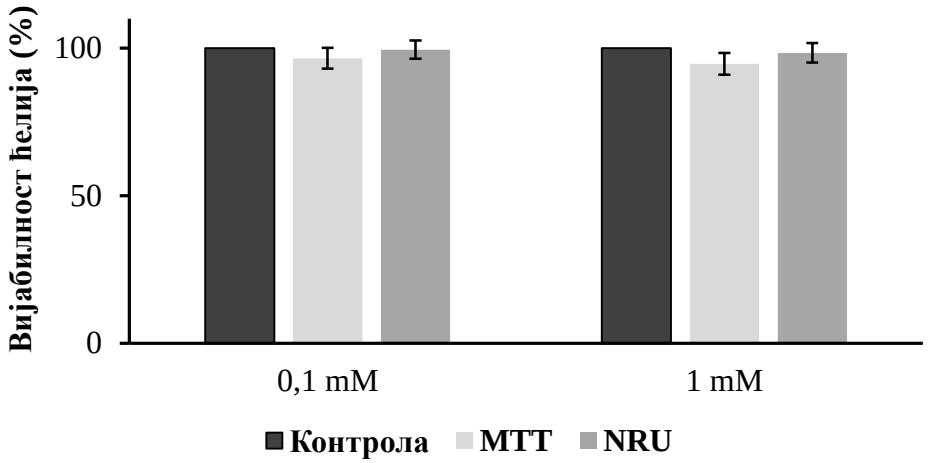


График 6. Метаболичка активност и вијабилност ћелија зубне пулпе након излагања ћелија фармаколошким концентрацијама МЕЛ (0,1 mM и 1 mM, 24 сата) испитивана МТТ и *NRU* тестовима. Резултати су представљени као средње вредности ± стандардна девијација за четири различита пацијента.

Концентрације протеина *iNOS, p300* и *GDNF* и активност *SOD* у култури ћелија зубне пулпе у условима *in vitro* хипергликемије

У испитивањима утицаја *in vitro* хипергликемије (72 сата) на ћелије зубне пулпе показано је да су концентрације протеина *iNOS, p300* и *GDNF* значајно повећане, док је активност *SOD* значајно смањена након излагања ћелија хипергликемији (*iNOS*: 0,31±0,01 ng/mL *vs* 0,40±0,01 ng/mL, $p<0,01$, График 7; *p300*: 12,86±0,26 ng/mL *vs* 16,12±0,39 ng/mL, $p<0,01$, График 8; *GDNF*: 120,0±7,36 pg/ml *vs* 168,1±5,83 pg/ml, $p<0,01$, График 9; *SOD*: 81,78±5,49% *vs* 68,56±3,77%, $p<0,05$, График 10). Применом Спирмановог теста утврђена је јака позитивна корелација између концентрације протеина *iNOS* и *p300* након излагања ћелија *in vitro* хипергликемији ($r=0,8526$, $p<0,001$).

Концентрације протеина *iNOS, p300* и *GDNF* и активност *SOD* у култури ћелија зубне пулпе након примене мелатонина у условима нормогликемије, *in vitro*

У испитивањима ефеката примене МЕЛ у концентрацији од 1mM (24 сата) на културама ћелије зубне пулпе у условима нормогликемије показано је да примена МЕЛ значајно повећава концентрацију протеина *iNOS* (0,31±0,01 ng/mL *vs* 0,39±0,01 ng/mL, $p<0,01$, График 7), док концентрација протеина *GDNF* није била значајно промењена (103,8±2,69 pg/ml *vs* 101,6±1,40 pg/ml, $p>0,05$, График 9). Са друге стране нижа концентрација МЕЛ (0,1 mM, 24 сата) није значајно утицала на концентрацију протеина *iNOS* (0,31±0,01 *vs* ng/mL 0,34±0,01 ng/mL, $p>0,05$, График 6), док је концентрација протеина *GDNF* значајно повећана након третмана ћелија МЕЛ (103,8±2,69 pg/ml *vs* 131,9±3,23 pg/ml, $p<0,05$, График 9). Обе коришћене концентрације МЕЛ нису значајно утицале на концентрацију протеина *p300* у условима нормогликемије (График 8) и на активност *SOD* (График 10). Наиме, концентрација протеина *p300* је износила 12,96±0,45 ng/mL при концентрацији МЕЛ од 0,1 mM и 12,85±0,21 ng/mL при концентрацији МЕЛ од 1mM, док је активност *SOD* била 79,00±3,16% (МЕЛ 0,1 mM) и 79,56±2,74% (МЕЛ 1 mM), што је било без значајне разлике ($p>0,05$) у односу на контролну групу без третмана МЕЛ (*p300*: 12,86±0,26 ng/mL; *SOD*: 81,78±5,49%).

Концентрације протеина *iNOS, p300* и *GDNF* и активност *SOD* у култури ћелија зубне пулпе након примене мелатонина у условима хипергликемије, *in vitro*

У експериментима на културама ћелија зубне пулпе у условима хипергликемије показано је да третман ћелија МЕЛ, у концентрацији од 1mM (24 сата), значајно смањује повећане концентрације протеина *iNOS*, *p300* и *GDNF* (*iNOS*: 0,40±0,01 ng/mL *vs* 0,34±0,01 ng/mL, $p<0,01$, График 7; *p300*: 16,12±0,39 ng/mL *vs* 11,59±0,58 ng/mL, $p<0,01$, График 8; *GDNF*: 168,10±5,83 pg/ml *vs* 113,50±5,23 pg/ml, $p<0,001$, График 9), док нижа концентрација МЕЛ (0,1mM, 24 сата) није значајно утицала на повећане концентрације протеина *iNOS*, *p300* и *GDNF* (*iNOS*: 0,40±0,01 ng/mL *vs* 0,39±0,01 ng/mL, $p>0,05$, График 7; *p300*: 16,12±0,39 ng/mL *vs* 13,90±0,41 ng/mL, $p>0,05$, График 8; *GDNF*: 168,10±5,83 pg/ml *vs* 165,70±8,17 pg/ml, $p>0,05$, График 9). Са друге стране обе испитиване концентрације МЕЛ доводе до значајног повећања смањене активности *SOD* у условима хипергликемије (1 mM: 68,56±3,77% *vs* 87,11±3,10%, $p<0,01$; 0,1 mM: 68,56±3,77% *vs* 82,78±3,59%, $p<0,05$, График 10). Јака корелација између концентрације протеина *iNOS* и *p300* добијена је након инкубације ћелија МЕЛ у концентрацији од 1mM (Спирман $r=0,8242$, $p<0,001$).

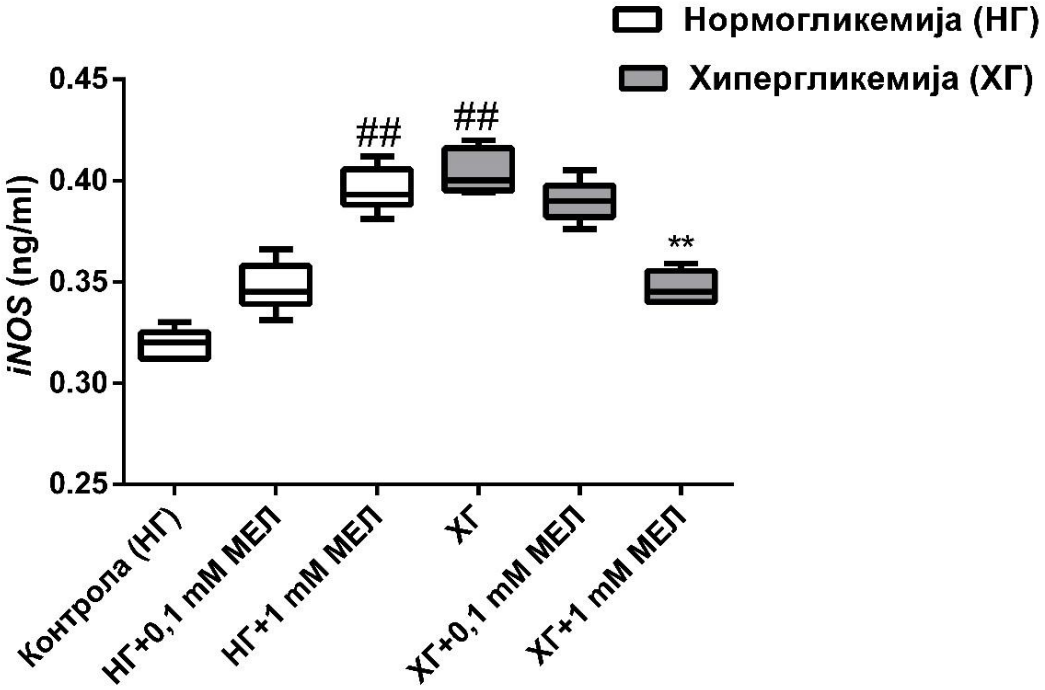


График 7. Ефекат примене мелатонина (МЕЛ, 0,1 mM и 1mM, 24 сата) на концентрацију протеина индуцибилне азот-моноксид синтазе (*iNOS*) у условима нормогликемије (НГ) и хипергликемије (ХГ) у култури ћелија зубне пулпе пореклом од три испитаника.

##p<0,01 у поређењу са НГ, **p<0,01 у поређењу са ХГ

Крускал-Валисов тест праћен Данетовим *post hoc* тестом

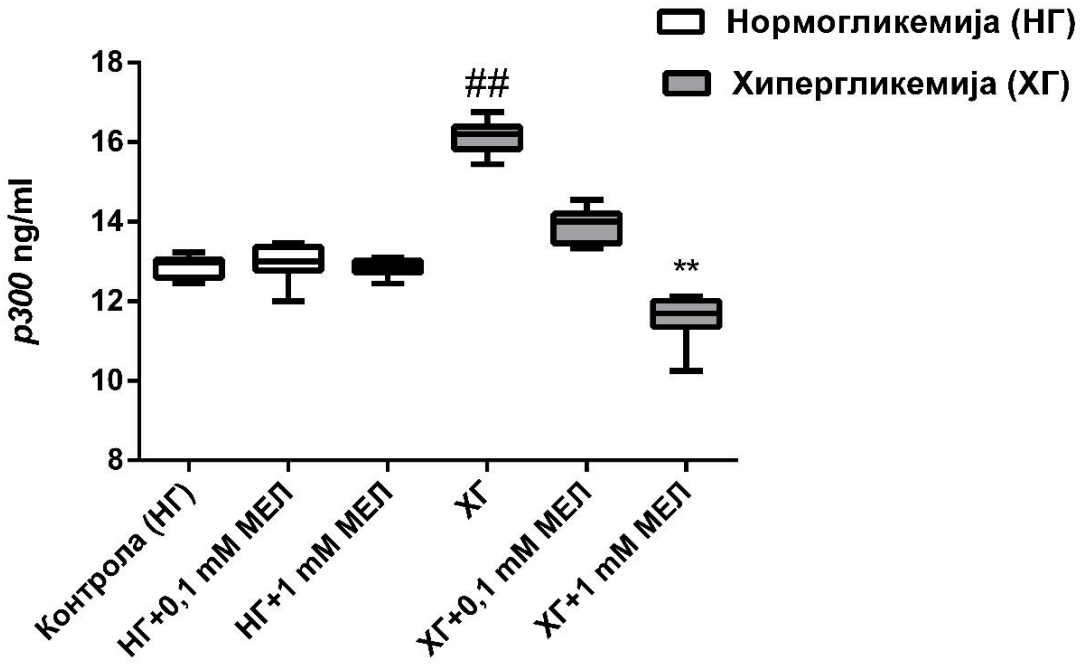


График 8. Ефекат примене мелатонина (МЕЛ, 0,1 mM и 1mM, 24 сата) на концентрацију протеина хистон ацетилтрансферазе п300 (*p300*) у условима нормогликемије (НГ) и хипергликемије (ХГ) у култури ћелија зубне пулпе пореклом од три испитаника.

##p<0,01 у поређењу са НГ, **p<0,01 у поређењу са ХГ

Крускал-Валисов тест праћен Данетовим *post hoc* тестом

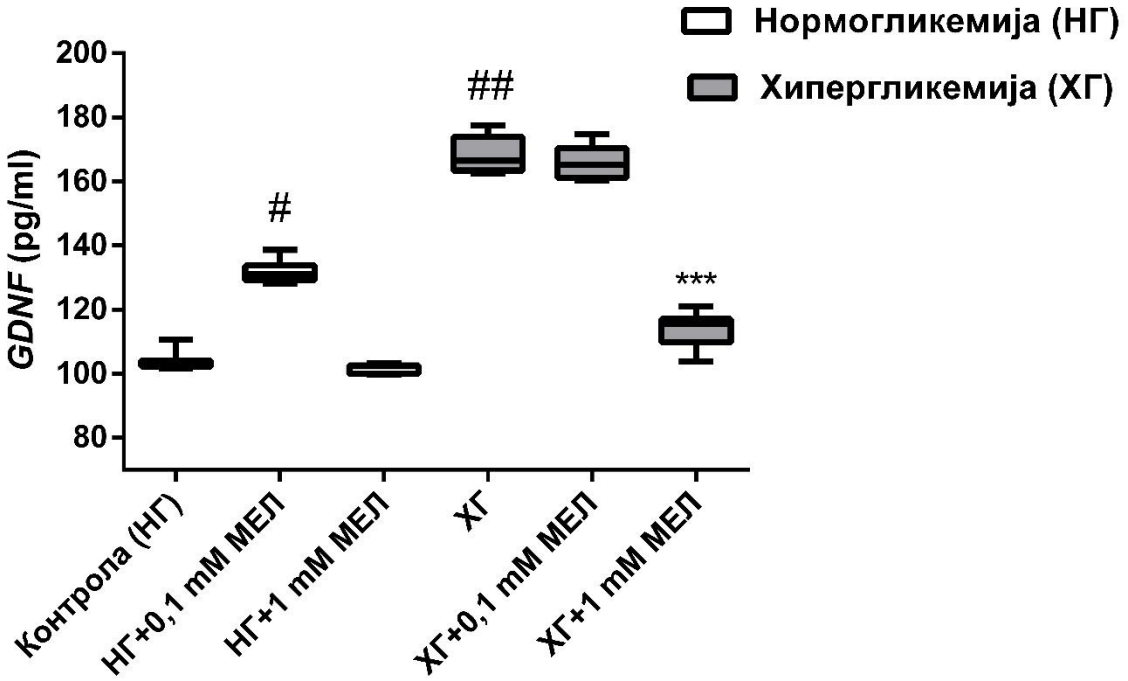


График 9: Ефекат примене мелатонина (МЕЛ, 0,1 mM и 1mM, 24 сата) на концентрацију протеина неуротрофног фактора пореклом глијалних ћелија (*GDNF*) у условима нормогликемије (НГ) и хипергликемије (ХГ) у култури ћелија зубне пулпе пореклом од три испитаника.

#$p<0,05$ и ##$p<0,01$ у поређењу са НГ, ***$p<0,001$ у поређењу са ХГ

Крускал-Валисов тест праћен Данетовим *post hoc* тестом

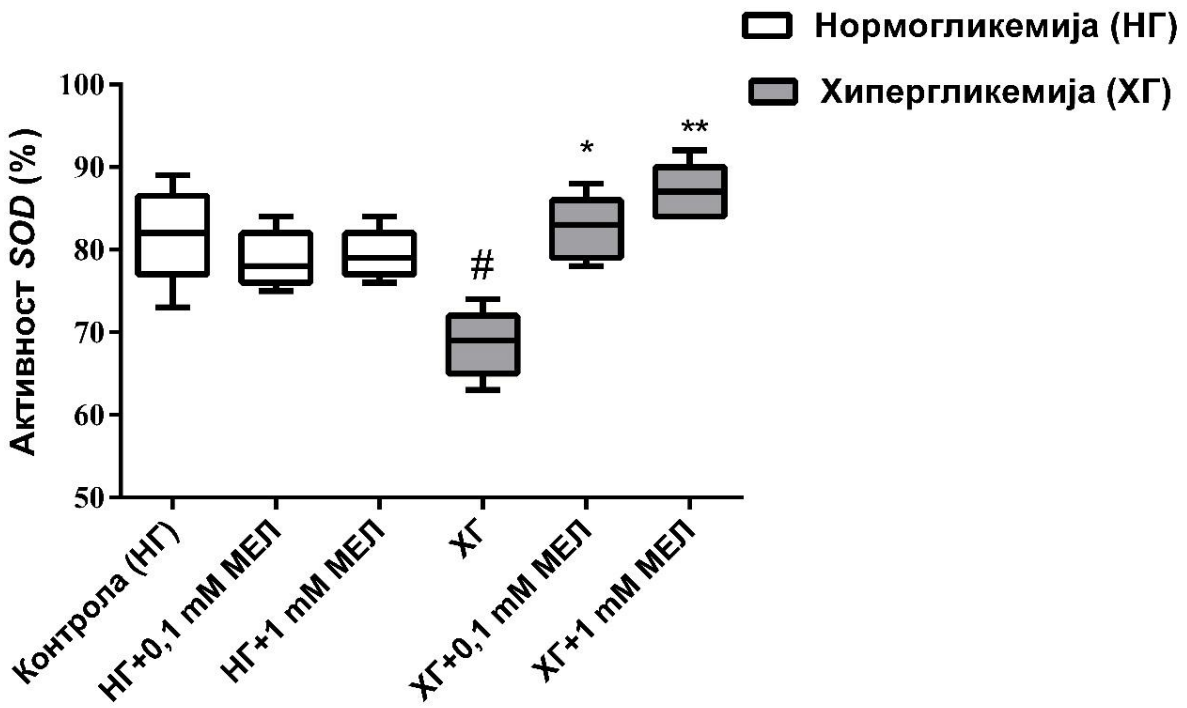


График 10. Ефекат примене мелатонина (МЕЛ, 0,1 mM и 1mM, 24 сата) на активност супореоксид дизмутазе (*SOD*) у условима нормогликемије (НГ) и хипергликемије (ХГ) у култури ћелија зубне пулпе пореклом од три испитаника.

#$p<0,05$ у поређењу са НГ, *$p<0,05$ и **$p<0,01$ у поређењу са ХГ

Крускал-Валисов тест праћен Данетовим *post hoc* тестом

ДИСКУСИЈА

Резултати наше студије показују да је ниво експресије протеина МЕЛ смањен у оралним ткивима оболелих од ДМ тип 2, као и да егзогену примена МЕЛ *in vitro* прати смањење параметара инфламације и оксидативно-нитрозативног стреса индукованих хипергликемијом у ћелијама зубне пулпе и паротидне пљувачне жлезде.

У сагласности са нашим резултатима су и резулати других клиничких истраживања, која, такође, указују на смањен ниво МЕЛ код оболелих од ДМ. Наиме, показан је смањен ниво МЕЛ у пљувачки оболелих од ДМ тип 1 и 2 [245, 249], као и смањен ниво ноћног и јутарњег МЕЛ у крви оболелих од ДМ тип 2 са пролиферативном ретинопатијом и кардијалном аутономном неуропатијом [250, 251], док је на експерименталним моделима за ДМ измерен смањен ниво МЕЛ у ткиву епифизе [252], панкреаса, бубрега и дуоденума [253]. Међутим, према нашим сазнањима, експресија протеина МЕЛ у хуманим оралним ткивима оболелих од ДМ до сада није испитивана. Механизми настанка дефицита МЕЛ у ДМ нису у потпуности истражени. Смањено стварање пинеалног МЕЛ у ДМ објашњава се смањеном активношћу ензима укључених у синтезу МЕЛ, али и смањеним нивоом *NA* и супстрата за синтезу МЕЛ у епифизи [254]. Додатно, смањењу нивоа МЕЛ у условима хипергликемије може допринети и повећана потрошња МЕЛ слободним радикалима у присуству хипергликемијом-индукованог оксидативно-нитрозативног стреса и инфламације [252, 255]. Наиме, оксидативно-нитрозативни стрес и инфламација су препознати као основни патогенетски механизми којима ДМ ремети хомеостазу у ткивима, укључујући и орална ткива [114, 129]. У нашој студији у прилог претходној тврдњи говори повећана експресија протеина *iNOS*, снажног прооксидативног и проинфламаторног медијатора [256], у паротидној пљувачној жлезди и зубној пулпи оболелих од ДМ тип 2, уз промену активности *SOD*. Поред ДМ, смањен ниво МЕЛ показан је и у другим обољењима и стањима, која деле исте патогенетске механизме са ДМ, као што су пародонтопатија [245], Паркинсонова и Алцхајмерова болест, поједини тумори и гојазност. Дефицит МЕЛ у овим обољењима може додатно допринети погоршању постојеће болести и, такође, створити услове за појаву и других поремећаја [173]. У прилог значаја МЕЛ у очувању редокс хомеостазе, наши резултати показују да дефицит МЕЛ у ткивима прати и промена активности *SOD*. Са друге стране и примарно смањена синтеза МЕЛ у епифизи, услед поремећаја спавања или као последица процеса старења и настанка одређених патолошких промена у структурама важним за синтезу пинеалног МЕЛ, као и услед поремећаја у експресији МТР, доводе се у везу са ремећењем биолошког циркадијалног ритма организма и појавом оксидативног стреса и инфламације, што погодује настанку поменутих обољења [173]. Смањена концентрација МЕЛ у пљувачним жлездама и у пљувачки оболелих од ДМ тип 2 може се објаснити и поремећајем у складиштењу и ослобађању МЕЛ у пљувачним жлездама [245, 249]. Наиме, *Isola et al*. су у имунохистохемијској студији показали да је код пацијената са добро контролисаним ДМ тип 2 број мелатонинских гранула у паротидној и субмандибуларној пљувачној жлезди смањен, при чему је, у поређењу са здравим жлезданим ткивом, густина МЕЛ у гранулама била већа у паротидној пљувачној жлезди оболелих од ДМ тип 2, вероватно услед поремећаја и у виду одложеног пражњења мелатонинских гранула. Како повећана густина МЕЛ у мелатонинским гранулама није забележена у субмандибуларној пљувачној жлезди, аутори су закључили да је паротидна пљувачна жлезда, у односу на субмандибуларну, више захваћена поменутим променама [257]. Имајући у виду да МЕЛ преко МТР стимулише синтезу и егзоцитозу протеина у ацинусним ћелијама паротидне пљувачне жлезде, смањено депоновање МЕЛ у пљувачним жлездама и његово одложено пражњење, може условити и смањену биоискористљивост МЕЛ у самим ацинусним ћелијама и тиме смањити синтезу и секрецију протеина у пљувачним жлездама [205, 258]. Са друге стране, постојање инфламаторних обољења у усној дупљи, такође, утиче на ниво МЕЛ у пљувачки и крви. Наиме, *Cutando et al*. су показали да је код оболелих од ДМ тип 1 и 2 ниво циркулаторног и саливарног МЕЛ значајно смањен, када је вредност пародонталног индекса (*The Community*

Periodontal Index, CPI) мања од 2, док се са већом вредношћу *CPI*, која указује на израженију инфламацију у пародонталним ткивима, ниво циркулаторног и саливарног МЕЛ се повећава на ниво измерен у физиолошким условима. Повећање концентрације МЕЛ је, вероватно, резултат одбрамбеног одговора организма на повећан степен запаљења у усној дупљи, са циљем да се поспеши оздрављење пародонталних ткива, јер МЕЛ, делујући антиоксидативно и имуномодулаторно, испољава антиинфламаторно дејство, чиме модулира активност остеокласта и остеобласта у корист остеобласта, смањујући на тај начин ресорпцију алвеоларне кости. Поред тога, показан је и стимулаторни ефекат МЕЛ на синтезу колагена тип 1, чиме МЕЛ поспешује формирање коштаног ткива [245].

У нашем истраживању смањен ниво МЕЛ у ткиву паротидне пљувачне жлезде оболелих од ДМ тип 2 праћен је и значајно повећаном активношћу *SOD*. Повећање активности *SOD* у ДМ представља адаптациони механизам којим се ткива штите од оштећења, јер *SOD* представља прву линију одбране од оксидативног стреса. Наиме, *SOD* неутралише супероксидни анјон чиме спречава стварање токсичног пероксинитрита и липидну пероксидацију [97]. Са друге стране, у ткиву зубне пулпе разлика у активности *SOD* између здравих испитаника и испитаника оболелих од ДМ тип 2 није показана, иако је уочена тенденција смањења активности *SOD* код оболелих од ДМ тип 2. У научној литератури се наводи да се на почетку болести активност *SOD* повећава као одговор ткива на повећан оксидативни стрес, али да се са трајањем болести, посебно након десет и петнаест година, активност *SOD* смањује [259]. У нашој студији просечно трајање ДМ тип 2 код испитаника укључених у прикупљање узорака ткива паротидне пљувачне жлезде било је шест година, док је код исптаника укључених у прикупљање узорака ткива зубне пулпе било девет и по година. Акумулација H_2O_2, насталог током аутооксидације глукозе, и гликозилација самог *SOD* описани су као патогенетски механизми који могу да смање и инактивирају активност *SOD* у условима хипергликемије [259, 260].

Повећан ниво експресије *GDNF* протеина у паротидној пљувачној жлезди и зубној пулпи оболелих од ДМ тип 2 у нашем истраживању упућује на могуће протективно дејство *GDNF* у оралним ткивима у присуству дисбаланса антиоксидативних и проинфламаторних медијатора [261, 262]. Наиме, у истраживањима на анималним моделима за ДМ смањен ниво *GDNF* доводи се у везу са настанком хроничних компликација ДМ, као што су ентерична неуропатија и поремећај сперматогенезе, при чему повећана експресија *GDNF* делује протективно у оба случаја [263, 264]. Такође, код трансгених мишева са повећаном експресијом *GDNF* у глијалним ћелијама панкреаса толеранција на глукозу је побољшана [265], што такође потврђује цитопротективну улогу *GDNF* у ДМ. У сагласности са нашим резултатима су и резултати студије *Bossa et al*. који су показали да се у стакластом телу оболелих од дијабетичне ретинопатије, која представља васкуларну, али и неуродегенеративну компликацију дијабетеса, концентрација неуротрофина и *GDNF* повећава уз постојање јаке корелације између нивоа неуротрофних фактора и проинфламаторних медијатора. Да инфламација представља сигнал за појачану секрецију *GDNF*, показано је и на култури Милерових глијалних ћелија. Наиме, када се ове ћелије, у *in vitro* условима, изложе дејству истих проинфламаторних медијатора чији је ниво повећан у стакластом телу, секреција *GDNF* се повећава [266]. Такође, на експерименталном моделу за повреду кичмене мождине показано је да у односу на саму повреду кичмене мождине примена бактеријских проинфламаторних липополисахарида доводи до додатне секреције *GDNF* од стране глијалних ћелија и макрофага, као и да додатна секреција *GDNF* проинфламаторном стимулацијом има за резултат успешнији опоравак оштећених нервних ћелија [267]. Стога повећан ниво *GDNF* у нашој студији у паротидној пљувачној жлезди и зубној пулпи оболелих од ДМ тип 2, вероватно, представља протективни одговор испитиваних ткива у условима хроничне инфламације на чије постојање указује истовремено повећан ниво *iNOS*. Такође, значајно повећан ниво *iNOS* показан је у култури ћелија паротидне пљувачне жлезде пореклом од оболелих од ДМ тип 2 и након треће пасаже ћелија гајених у условима нормогликемије,

што се може објаснити феноменом хипергликемијске меморије који подразумева повећану експресију проинфламаторних гена и након престанка деловања хипергликемије [154]. Повећан ниво *iNOS* у ДМ, уз прооксидативни и проинфламаторни ћелијски статус, показан је и у другим ћелијама и ткивима, као што су тромбоцити, макрофаге, срчани мишић и скелетни мишићи и у хуманим ендотелним ћелијама изложених *in vitro* хипергликемији [268-270]. Повећање нивоа *iNOS*, уз поремећај нивоа и биоискористљивости *NO*, значајан је патогенетски механизам у настанку не само ДМ, већ и у настанку ендотелне дисфункције, септичног шока, хиперхолестеролемије, астме, артритиса, псоријазе, мултипле склерозе, неуродегенеративних обољења, колитиса, али и у туморогенези [116]. У нашем истраживању показана је и конститутивна експресија протеина *iNOS* у ткивима паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе, без обзира на узраст испитаника, што је у супротности са другим органима [271]. Која је улога конститутивно присутног *iNOS* у ткивима још није познато. Могући разлог конститутивне експресије *iNOS* у епителним ћелијама ГИТ и респираторним епителним ћелијама је изложеност ових ћелија микроорганизмима и антимикробни ефекат *NO* који се испољава само када се *NO* ствара у већој количини за шта је потребна активност *iNOS* који има десетинама пута већу активност од *eNOS* [272]. Сматра се да у почетној фази ДМ долази до повећаног стварања *NO* од стране *iNOS* који врло брзо ступа у реакцију са супероксидним анјоном и ствара токсичан пероксинитрит, док у одмаклој фази болести, без обзира на повећану синтезу *iNOS*, долази до смањеног стварања *NO*, вероватно због сниженог нивоа супстрата Л-Арг и кофактора тетрахидробиоптерина услед њихове оксидације или смањене синтезе. У недостатку супстрата и кофактора *iNOS* постаје некуплован, што подразумева да *iNOS*, уместо да синтетише *NO*, доприноси додатном стварању супероксидног анјона и продубљивању оксидативног стреса [273]. Постојање хроничне инфламације уз смањен антиоксидативни капацитет и поремећај редокс равнотеже у оралним ткивима у ДМ тип 2 временом може ослабити функцију и репараторни потенцијал оралних ткива и нарушити оралну хомеостазу. Наиме, поремећај *NOS-NO* система значајан је механизам у настанку хипосаливације и ксеростомије не само у ДМ, већ и код Сјогреновог синдрома, реуматоидног артритиса и код зрачне терапије тумора главе и врата [35]. Механизами којима повећан ниво *NO* пореклом *iNOS* доводи до хипославиције укључују поремећај у снабдевању пљувачних жлезда крвљу и смањен M_3P-посредован секреторни одговор пљувачних жлезда [274], као и активацију *COX*-2 и стварање простагландина који инхибирају секрецију пљувачке и додатно повећавају ниво *iNOS* [275]. Стога регулација нивоа *iNOS* може допринети очувању секреторне функције пљувачних жлезда у ДМ.

Како старење [276] и могуће промене у ткиву зубне пулпе изазване ДМ имају за последицу смањен пролиферативни капацитет ћелија зубне пулпе са последично недовољним бројем ћелија за обављање нашег истраживања, као и ради ближег увида у молекуларне механизме настанка оштећења ћелија зубне пулпе у ДМ, испитивање на ћелијама зубне пулпе спроведено је на културама ћелија изолованих од младих здравих испитаника у условима *in vitro* индуковане хипергликемије. Након 72 сата од излагања ћелија зубне пулпе *in vitro* хипергликемији ниво експресије протеина *iNOS* био је значајно повећан уз смањену активност *SOD*, указујући на дисбаланс у стварању и елиминацији слободних радикала. Разлог реципрочног односа у активности *iNOS* и *SOD* у нашој студији може бити присутво велике количине *NO*. У таквим околностима *NO* показује већи афинитет за супероксидни анјон од *SOD* [277]. Додатно, кисеонични и азотни слободни радикали могу да смање експресију гена антиоксидативних ензима, укључујући и експресију гена за *SOD* [278]. Различита активност *SOD* у ткиву и у култури ћелија зубне пулпе у нашој студији може бити условљена различитим степеном гликозилације *SOD* у условима *in vivo* и *in vitro* хипергликемије, као и у студији *Arai et al*. који су исти резултат добили када су испитивање спровели на еритроцитима у условима *in vivo* и *in vitro* хипергликемије [279].

За разлику од *eNOS* и *nNOS* који подлежу директној модулацији активности, степен активности *iNOS* примарно зависи од његове количине у ткиву [116]. Кључну улогу у контроли

експресије гена за *iNOS* (*NOS2*) има транскрипциони фактор *NF-κB*. Активација *NF-κB/iNOS* проинфламаторног сигналног пута је под снажном контролом епигенетичких механизама који су високо ћелијски специфични и комплексни, јер често је у истој ћелији у активацији овог сигналног пута укључено више различитих епигенетичких механизама [243, 280]. Све већи број истраживања показује да су епигенетички механизми кључни у настанку инсулинске резистенције и хипергликемијске меморије за коју се верује да се налази у основи хроничних компликација дијабетеса. Као иницијални догађај у активацији епигенетичких механизама који повећавају транскрипциони потенцијал *NF-κB* наводи се хипергликемијом-индуковано повећано стварање супероксидног анјона у митохондријама [281]. За потпуни транскрипциони потенцијал *NF-κB* веома је значајна његова интеракција са специфичним транскрипционим кофакторима од којих је посебно важна хистон ацетилтрансфераза *p300* [282]. Наиме, *p300*, ацетилацијом хистона и транскрипционих фактора, повећава експресију бројних гена, укључујући и експресију *NOS2* гена [283, 284]. У нашем истраживању повећан ниво експресије протеина *p300* показан је у култури ћелија паротидне пљувачне жлезде пореклом оболелих од ДМ тип 2, као и у култури ћелија зубне пулпе након излагања ћелија *in vitro* хипергликемији. У ћелијама паротидне пљувачне жлезде пореклом оболелих од ДМ тип 2 значајна корелација између нивоа протеина *p300* и *iNOS* није показана. Међутим, јака позитивна корелација нађена је између нивоа протеина *p300* и *iNOS* у ћелијама зубне пулпе у условима *in vitro* хипергликемији. Стога, могуће је да механизам који доводи до повећања нивоа *iNOS* у ћелијама зубне пулпе у условима *in vitro* хипергликемије укључује активацију *p300*/*NF-κB*/*iNOS* каскаде, јер је већ показано да активација *p300*/*NF-κB* каскаде доприноси развоју хроничних компликација ДМ [285-287]. Стога проналажење епигенетичког лека који би утицао на деактивацију *p300*/*NF-κB*/*iNOS* сигналног пута могло би да допринесе бољој терапији хроничних компликација ДМ. У том смислу имајући у виду антиоксидативну и антиинфламаторну улогу МЕЛ, које су, између осталог, посредоване епигенетичким механизмима, испитује се примена МЕЛ у терапији компликација ДМ.

У нашем истраживању испитивањима антиинфламаторног и антиоксидативног дејства фармаколошких концентрација МЕЛ на културама ћелија паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе у условима ћелијске инфламације посредоване ДМ тип 2 или *in vitro* хипергликемијом претходила су испитивања биокомпатибилности МЕЛ, МТТ и *NRU* тестовима. Установљено је да МЕЛ у концентрацији од 0,1 mM није значајано утицао на метаболичку активност и вијабилност ћелија паротидне пљувачне жлезде, али да у концентрацији од 1 mM делује цитотоксично јер смањује метаболичку акивност ћелија за скоро 20%, испитано МТТ тестом, док је вредност *NRU* теста била благо повећана. Дискрепанца између вредности МТТ и *NRU* теста указује да потенцијални механизам цитотоксичног деловања МЕЛ (1 mM) на ћелије паротидне пљувачне жлезде укључује оштећење митохондрија, које је праћено активацијом ћелијског хомеостатског процеса митофагије, током којег се, појачаном активношћу лизозама, уклањају оштећене митохондрије. У супротном, услед акумулације оштећених митохондрија дошло би до ослобађања проапоптотских протеина уз појаву оксидативног стреса и настанка геномске нестабилности ћелије [288]. И у другим *in vitro* истраживањима показано је да, у зависности од типа ћелије, редокс статуса у ћелији, примењене концентрације МЕЛ и дужине излагања ћелија дејству МЕЛ, МЕЛ може да испољи про-оксидативни ефекат са последичним оштећењем митохондрија [289, 290]. Стога је у нашим *in vitro* испитивањима на културама ћелија паротидне пљувачне жлезде коришћена фармаколошка концентрација МЕЛ од 0,1 mM, док су у испитивањима ефеката примене МЕЛ на културама ћелија зубне пулпе коришћене обе концентрације МЕЛ (0,1 mM и 1 mM), јер њихова примена није деловала цитотоксично на ћелије зубне пулпе.

Резултати наших испитивања на културама ћелија паротидне пљувачне жлезде показују да МЕЛ у концентрацији од 0,1 mM у култури ћелија пореклом од здравих испитаника не утиче значајно на ниво протеина *iNOS* и *p300*, али да повећава ниво протеина *GDNF* и активност *SOD*, као цитопротективних молекула. И у другим истраживањима показано је да егзогена

примена МЕЛ, у физиолошким или фармаколошким концентрацијама, у условима базалног оксидативног стреса повећава активност антиоксидативних ензима, пре свега *SOD* и глутатион пероксидазе [123]. Са друге стране у нашем истраживању показано је да примена МЕЛ у културама ћелија паротидне пљувачне жлезде пореколом од оболелих од ДМ тип 2 нормализује повећану активност *SOD*, док значајан утицај МЕЛ на повећан ниво протеина *iNOS, p300* и *GDNF* није показан. Мали број испитаника укључених у истраживање на културама ћелија паротидне пљувачне жлезде представља ограничење наше студије. Утицај МЕЛ на активност *SOD* у ДМ показан је и у ткивима дијабетичних пацова, код којих системска примена МЕЛ, такође, смањује повећану активност *SOD* у ткиву бубрега и јетре, док са друге стране у еритроцитима повећава смањену активност *SOD*, те се може претпоставити да ефекат МЕЛ на активност *SOD* зависи од редокс статуса у ћелији [291]. Повољан ефекат МЕЛ на антиоксидативни капацитет ткива показан је и у другим обољењима, као што је Паркинсонова болест, где примена МЕЛ повећава активност *SOD* и глутатион пероксидазе. Механизми којима МЕЛ утиче на експресију гена антиоксидативних ензима и на њихову активност још увек нису јасни. Могуће је да МЕЛ неутралишући слободне радикале мења редокс статус у ћелији или да је ефекат посредован мелатонинским рецепторима [123].

У испитивањима ефеката МЕЛ на хуманим културама ћелија зубне пулпе изложених *in vitro* хипергликемији резултати наше студије показују да МЕЛ у концентрацији од 1 mM смањује хипергликемијом-изазвано повећање нивоа протеина *iNOS, p300* и *GDNF*, као и да повећава хипергликемијом смањену активност *SOD*. МЕЛ у концентрацији од 1 mM, али не и у концентрацији од 0,1 mM, смањује повећану експресију протеина *iNOS* у хипергликемији, док је у условима нормогликемије повећава. *Franco & Markus* су у својој студији, такође, показали да инкубација ћелија малог мозга са МЕЛ доводи до повећања или до смањења нивоа *iNOS* у зависности од активације *NF-κB* транскрипционог фактора. Наиме, када је *NF-κB* већ активиран проинфламаторним молекулима, МЕЛ инхибира *NF-κB* и експресију *iNOS*, чиме смањује синтезу *NO* и испољава цитопротективни ефекат. Са друге стране у физиолошким условима, када ћелије нису третиране липополисахаридима, МЕЛ доводи до активације *NF-κB*, што има за последицу повећање експресије *iNOS* и синтезе *NO* уз смањену вијабилност ћелија [292]. С обзиром да и у нашем истраживању МЕЛ у условима нормогликемије повећава, док у условима хипергликемије, која је добро познат активатор *NF-κB*, смањује концентрацију *iNOS*, истим принципом бе се могао претпоставити ефекат МЕЛ у ћелијама зубне пулпе у нашем истраживању. Како су неуропротективни [293] и антиинфламаторни ефекти МЕЛ посредовани активношћу *p300* [243], испитан је ефекат МЕЛ и на ниво протеина *p300*. МЕЛ у концентрацији од 1 mM у условима хипергликемије смањује повећану концентрацију *p300* у ћелијама зубне пулпе, при чему је добијена јака позитивна корелација између нивоа *p300* и *iNOS* након инкубације ћелија МЕЛ. Добијени резултати упућују на претпоставку да МЕЛ у условима хипергликемије у култури ћелија зубне пулпе, инхибицијом *p300* епигенетичким механизмом, делује антиинфламаторно кроз супресију експресије протеина *iNOS*. Имајући у виду да инфламација представља сигнал за повећану секрецију *GDNF* [266, 267], МЕЛ вероватно делујући антиинфламаторно нормализује повећан ниво *GDNF* у култури ћелија зубне пулпе у условима хипергликемије [294]. Показано је да у условима ћелијског стреса повећање нивоа *GDNF* представља одбрамбени одговор ћелија и да *GDNF*, између осталог, регулише и активност антиоксидативних ензима [295-297]. Улога *GDNF* у очувању ткивне хомеостазе запажена је и у оралним ткивима. Наиме, *Gale et al*. су показали да додавање *GDNF* у културу ћелија зубне пулпе у условима инфламације и дефицита трофичких фактора, инхибицијом процеса апоптозе, поспешује преживљавање ћелија зубне пулпе и стимулише њихову пролиферацију, те да *GDNF*, чије је присуство забележено и у дентинском матриксу, може имати важну улогу у очувању хомеостазе пулпо-дентинског комплекса [261]. Такође, обе испитиване фармаколошке концентрације МЕЛ нормализују активност *SOD*. Овај ефекат МЕЛ остварује, вероватно, у условима високе концентрације *NO* директним неутралисањем самог *NO* и смањењем експресије *iNOS* [298]. МЕЛ такође, у фармаколошким и физиолошким

концентрацијама, има способност да повећа експресију гена за *SOD* или да повећа активност *SOD* [299, 300]. Стога нормализација нивоа експресије протеина *iNOS* и *GDNF*, као и активности *SOD* након примене МЕЛ указује на протективни ефекат МЕЛ према ћелијама зубне пулпе у условима *in vitro* хипергликемије. Резултати нашег истраживања дају допринос у разматрању примене МЕЛ у терапији не само ДМ и његових компликација, већ и у терапији обољења која деле патогенетске механизме са ДМ, као што су пародонтопатија и неуродегенеративна обољења [301].

ЗАКЉУЧЦИ

На основу добијених резултата закључци нашег истраживања су следећи:

1) концентрација МЕЛ је смањена, док су концентрације *iNOS* и *GDNF* повећане, у ткивима паротидне пљувачне жлезде и зубне пулпе оболелих од ДМ тип 2 у односу на здраве испитанике, што упућује на закључак о значајном поремећају у експресији про- и анти-инфламаторних медијатора у оралним ткивима у ДМ тип 2;

2) активност антиоксидативног ензима, *SOD*, повећана је у ткиву паротидне пљувачне жлезде, али не и зубне пулпе оболелих од ДМ тип 2, што говори у прилог поремећаја антиоксидативне заштите у оралним ткивима у ДМ тип 2;

3) фармаколошке концентрације МЕЛ (0,1 mM и 1 mM) не утичу на метаболичку активност и вијабилност ћелија зубне пулпе; MEL у концентрацији од 1 mM, али не и у концентрацији од 0,1 mM, делује цитотоксично на ћелије паротидне пљувачне жлезде;

4) примена МЕЛ, у концентрацији од 0,1 mM, повећава активност *SOD* и концентрацију *GDNF* у култури ћелија паротидне пљувачне жлезде пореклом од здравих испитаника, и смањује повећану активност *SOD*, у ћелијама жлезде пореклом оболелих од ДМ тип 2;

5) примена МЕЛ у концентрацији од 0,1 mM, повећава концентрацију *GDNF*, не утичући значајно на концентрације *iNOS* и *p300* у култури ћелија зубне пулпе у условима нормогликемије, док примењен у већој концентрацији МЕЛ (1 mM) доводи до повећања концентрације *iNOS*, испољавајући проинфламаторни ефекат;

6) примена МЕЛ у концентрацији од 0,1 mM, нормализује активност *SOD*, не утичући значајно на концентрације *iNOS*, *p300* и *GDNF* у култури ћелија зубне пулпе у условима хипергликемије;

7) у концентрацији од 1 mM МЕЛ смањује хипергикемијом-индуковано повећање концентрације *iNOS*, *p300* и *GDNF* и нормализује смањену активност СОД, чиме испољава протективно дејство на ћелије зубне пулпе у условима *in vitro* хипергликемије;

8) постоји јака позитивна повезаност концентрације *iNOS* и *p300* у ћелијама зубне пулпе у условима хипергликемије и након примене МЕЛ, што упућује на епигенетички механизам антиинфламаторног дејства МЕЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabetic Medicine, 1998; 15: 539-53.

2. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. Physiological Reviews, 2018; 98: 2133-223.

3. World Health Organization (WHO) centre. Global report on diabetes. Diabetes. 2016. https://www.who.int/publications/i/item/9789241565257

4. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, Colagiuri S, Guariguata L, Motala AA, Ogurtsova K, Shaw JE, Bright D, Williams R. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. Diabetes Research and Clinical Practice, 2019; 157: 107843.

5. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“. Incidencija i mortalitet od dijabetesa u Srbiji. 2020. https://www.batut.org.rs/download/publikacije/Dijabetes2020.pdf

6. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature, 2001, 414: 799-806.

7. Aronoff SL, Berkowitz K, Shreiner B, Want L. Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. Diabetes Spectrum, 2004, 17: 183-90.

8. Association AD. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care, 2013, 37: S81-S90.

9. Oguntibeju OO. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology, 2019; 11: 45-63.

10. Ormazabal V, Nair S, Elfeky O, Aguayo C, Salomon C, Zuñiga FA. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. Cardiovascular Diabetology, 2018; 17: 122.

11. Loewen SL, Haas LB. Complications of diabetes: acute and chronic. Nurse Practitioner Forum, 1991; 2: 181-7.

12. Carey IM, Critchley JA, DeWilde S, Harris T, Hosking FJ, Cook DG. Risk of Infection in Type 1 and Type 2 Diabetes Compared With the General Population: A Matched Cohort Study. Diabetes Care, 2018; 41: 513-21.

13. Casqueiro J, Casqueiro J, Alves C. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. Indian Journal of Endocrinology and Metabolism, 2012; 16: S27-S36.

14. Lilliu MA, Solinas P, Cossu M, Puxeddu R, Loy F, Isola R, Quartu M, Melis T, Isola M. Diabetes causes morphological changes in human submandibular gland: a morphometric study. Journal of Oral Pathology and Medicine, 2015; 44: 291-5.

15. Stewart CR, Obi N, Epane EC, Akbari AA, Halpern L, Southerland JH, Gangula PR. Effects of Diabetes on Salivary Gland Protein Expression of Tetrahydrobiopterin and Nitric Oxide Synthesis and Function. Journal of Periodontology, 2016; 87: 735-41.

16. Bender IB, Bender AB. Diabetes mellitus and the dental pulp. Journal of Endodontics, 2003; 29: 383-9.

17. Kim H, Park J-W, Yeo S, Choi B, Suh J. Effects of high glucose on cellular activity of periodontal ligament cells in vitro. Diabetes Research and Clinical Practice, 2006; 74: 41-7.

18. Wu Y-Y, Xiao E, Graves DT. Diabetes mellitus related bone metabolism and periodontal disease. International Journal of Oral Science, 2015; 7: 63-72.

19. Bastos AS, Leite AR, Spin-Neto R, Nassar PO, Massucato EM, Orrico SR. Diabetes mellitus and oral mucosa alterations: prevalence and risk factors. Diabetes Research and Clinical Practice, 2011; 92: 100-5.

20. Mauri-Obradors E, Estrugo-Devesa A, Jané-Salas E, Viñas M, López-López J. Oral manifestations of Diabetes Mellitus. A systematic review. Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal, 2017; 22: e586-e94.

21. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, Taylor R. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. Diabetologia, 2012; 55: 21-31.

22. Lamster IB, Pagan M. Periodontal disease and the metabolic syndrome. International Dental Journal, 2017; 67: 67-77.

23. Mammen J, Vadakkekuttical RJ, George JM, Kaziyarakath JA, Radhakrishnan C. Effect of non-surgical periodontal therapy on insulin resistance in patients with type II diabetes mellitus and chronic periodontitis, as assessed by C-peptide and the Homeostasis Assessment Index. Journal of Investigative and Clinical Dentistry, 2017; 8: e12221.

24. Rhodus NL, Brown J. The association of xerostomia and inadequate intake in older adults. Journal of the American Dietetic Association, 1990; 90: 1688-92.

25. Doel JJ, Hector MP, Amirtham CV, Al-Anzan LA, Benjamin N, Allaker RP. Protective effect of salivary nitrate and microbial nitrate reductase activity against caries. European Journal of Oral Sciences, 2004; 112: 424-8.

26. Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? Caries Research, 2004; 38: 247-53.

27. Mandel ID. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. Journal of the American Dental Association, 1989; 119: 298-304.

28. Mese H, Matsuo R. Salivary secretion, taste and hyposalivation. Journal of Oral Rehabilitation, 2007; 34: 711-23.

29. Qin L, Liu X, Sun Q, Fan Z, Xia D, Ding G, Ong HL, Adams D, Gahl WA, Zheng C, Qi S, Jin L, Zhang C, Gu L, He J, Deng D, Ambudkar IS, Wang S. Sialin (SLC17A5) functions as a nitrate transporter in the plasma membrane. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012; 109: 13434-9.

30. Proctor GB. The physiology of salivary secretion. Periodontology 2000, 2016; 70: 11-25.

31. Dawes C, Wood CM. The contribution of oral minor mucous gland secretions to the volume of whole saliva in man. Archives of Oral Biology, 1973; 18: 337-42.

32. Navazesh M, Kumar SK. Measuring salivary flow: challenges and opportunities. Journal of the American Dental Association, 2008; 139: 35s-40s.

33. Schneyer LH, Levin LK. Rate of secretion by individual salivary gland pairs of man under conditions of reduced exogenous stimulation. Journal of Applied Physiology, 1955; 7: 508-12.

34. Ferreira Jã N, Hoffman MP. Interactions between developing nerves and salivary glands. Organogenesis, 2013; 9: 199-205.

35. Bhattarai KR, Junjappa R, Handigund M, Kim H-R, Chae H-J. The imprint of salivary secretion in autoimmune disorders and related pathological conditions. Autoimmunity Reviews, 2018; 17: 376-90.

36. Garrett JR, Kidd A. The innervation of salivary glands as revealed by morphological methods. Microscopy Research and Technique, 1993; 26: 75-91.

37. Melvin JE, Yule D, Shuttleworth T, Begenisich T. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. Annual Review of Physiology, 2005; 67: 445-69.

38. Gautam D, Heard TS, Cui Y, Miller G, Bloodworth L, Wess J. Cholinergic stimulation of salivary secretion studied with M1 and M3 muscarinic receptor single- and double-knockout mice. Molecular Pharmacology, 2004; 66: 260-7.

39. Khalafalla MG, Woods LT, Jasmer KJ, Forti KM, Camden JM, Jensen JL, Limesand KH, Galtung HK, Weisman GA. P2 Receptors as Therapeutic Targets in the Salivary Gland: From Physiology to Dysfunction. Frontiers in Pharmacology, 2020; 11: 222.

40. Garrett JR. The proper role of nerves in salivary secretion: a review. Journal of Dental Research, 1987; 66: 387-97.

41. Proctor GB, Carpenter GH. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical, 2007; 133: 3-18.

42. Anderson LC, Garrett JR. Neural regulation of submandibular gland blood flow in the streptozotocin-diabetic rat: evidence for impaired endothelium-dependent vasodilatation. Archives of Oral Biology, 2004; 49: 183-91.

43. Avogaro A, Albiero M, Menegazzo L, de Kreutzenberg S, Fadini GP. Endothelial dysfunction in diabetes: the role of reparatory mechanisms. Diabetes Care, 2011; 34: S285-S90.

44. Thakor AS, Brown CN, Edwards AV. Effects of prolonged reduction in blood flow on submandibular secretory function in anesthetized sheep. Journal of Applied Physiology, 2003; 95: 751-7.

45. Davarpanah M, Shokri-mashhadi N, Ziaei R, Saneei P. A systematic review and meta-analysis of association between brain-derived neurotrophic factor and type 2 diabetes and glycemic profile. Scientific Reports, 2021; 11: 13773.

46. Hayashi K, Storesund T, Schreurs O, Khuu C, Husvik C, Karatsaidis A, Helgeland K, Martin-Zanca D, Schenck K. Nerve growth factor beta/pro-nerve growth factor and their receptors in normal human oral mucosa. European Journal of Oral Sciences, 2007; 115: 344-54.

47. Abe K. Therapeutic Potential of Neurotrophic Factors and Neural Stem Cells Against Ischemic Brain Injury. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2000; 20: 1393-408.

48. Tsunekawa H, Suzuki Y, Obara N, Takeda M. Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor in Myoepithelial Cells of Major and Minor Salivary Glands of Mice. Journal of Oral Biosciences, 2006; 48: 266-77.

49. Xiao N, Lin Y, Cao H, Sirjani D, Giaccia AJ, Koong AC, Kong CS, Diehn M, Le QT. Neurotrophic factor GDNF promotes survival of salivary stem cells. Journal of Clinical Investigation, 2014; 124: 3364-77.

50. Peng X, Varendi K, Maimets M, Andressoo JO, Coppes RP. Role of glial-cell-derived neurotrophic factor in salivary gland stem cell response to irradiation. Radiotherapy and Oncology, 2017; 124: 448-54.

51. Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB, Nauntofte B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. Oral Diseases, 2002; 8: 117-29.

52. Löfgren CD, Wickström C, Sonesson M, Lagunas PT, Christersson C. A systematic review of methods to diagnose oral dryness and salivary gland function. BMC Oral Health, 2012; 12: 29.

53. Eveson JW. Xerostomia. Periodontology 2000, 2008; 48: 85-91.

54. Dawes C. How much saliva is enough for avoidance of xerostomia? Caries Research, 2004; 38: 236-40.

55. Sreebny LM, Yu A, Green A, Valdini A. Xerostomia in diabetes mellitus. Diabetes Care, 1992; 15: 900-4.

56. Borgnakke WS, Anderson PF, Shannon C, Jivanescu A. Is there a relationship between oral health and diabetic neuropathy? Current Diabetes Reports, 2015; 15: 93.

57. Mednieks MI, Szczepanski A, Clark B, Hand AR. Protein expression in salivary glands of rats with streptozotocin diabetes. International Journal of Experimental Pathology, 2009; 90: 412-22.

58. Jarvinen VK, Rytomaa, II, Heinonen OP. Risk factors in dental erosion. Journal of Dental Research, 1991; 70: 942-7.

59. Gandara BK, Morton TH. Non-Periodontal Oral Manifestations of Diabetes: A Framework for Medical Care Providers. Diabetes Spectrum, 2011; 24: 199-205.

60. Dormenval V, Budtz-Jorgensen E, Mojon P, Bruyere A, Rapin CH. Associations between malnutrition, poor general health and oral dryness in hospitalized elderly patients. Age Ageing, 1998; 27: 123-8.

61. Matsuo R. Role of saliva in the maintenance of taste sensitivity. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine, 2000; 11: 216-29.

62. Han P, Suarez-Durall P, Mulligan R. Dry mouth: a critical topic for older adult patients. Journal of Prosthodontic Research, 2015; 59: 6-19.

63. Saleh J, Figueiredo MA, Cherubini K, Salum FG. Salivary hypofunction: an update on aetiology, diagnosis and therapeutics. Archives of Oral Biology, 2015; 60: 242-55.

64. Mata AD, Marques D, Rocha S, Francisco H, Santos C, Mesquita MF, Singh J. Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. Molecular and Cellular Biochemistry, 2004; 261: 137-42.

65. Watanabe M, Yamagishi-Wang H, Kawaguchi M. Lowered susceptibility of muscarinic receptor involved in salivary secretion of streptozotocin-induced diabetic rats. Japanese Journal of Pharmacology, 2001; 87: 117-24.

66. Xiang R-L, Huang Y, Zhang Y, Cong X, Zhang Z-J, Wu L-L, Yu G-Y. Type 2 diabetes-induced hyposalivation of the submandibular gland through PINK1/Parkin-mediated mitophagy. Journal of Cellular Physiology, 2020; 235: 232-44.

67. Lilliu MA, Loy F, Cossu M, Solinas P, Isola R, Isola M. Morphometric Study of Diabetes Related Alterations in Human Parotid Gland and Comparison with Submandibular Gland. Anatomical Record (Hoboken), 2015; 298: 1911-8.

68. Russotto SB. Asymptomatic parotid gland enlargement in diabetes mellitus. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1981; 52: 594-8.

69. Mandel L, Patel S. Sialadenosis associated with diabetes mellitus: a case report. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2002; 60: 696-8.

70. Ambudkar IS. Calcium signalling in salivary gland physiology and dysfunction. The Journal of Physiology, 2016; 594: 2813-24.

71. High AS, Sutton J, Hopper AH. A morphometric study of submandibular salivary gland changes in streptozotocin-induced diabetic rats. Archives of Oral Biology, 1985; 30: 667-71.

72. Wirostko B, Wong TY, Simo R. Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. Progress in Retinal and Eye Research, 2008; 27: 608-21.

73. Perrotti V, Piattelli A, Piccirilli M, Bianchi G, Di Giulio C, Artese L. Vascular endothelial growth factor expression (VEGF) in salivary glands of diabetic rats. International Journal of Immunopathology and Pharmacology, 2007; 20: 55-60.

74. Perrotti V, Piattelli A, Piccirilli M, Bianchi G, Di Giulio C, Artese L. Vascular endothelial growth factor expression (VEGF) in salivary glands of diabetic rats. International Journal of Immunopathology and Pharmacology, 2007; 20: 55-60.

75. Roganovic J, Radenkovic M, Tanic N, Tanic N, Petrovic N, Stojic D. Impairment of acetylcholine-mediated endothelium-dependent relaxation in isolated parotid artery of the alloxan-induced diabetic rabbit. European Journal of Oral Sciences, 2011; 119: 352-60.

76. Apfel SC. Neurotrophic Factors and Diabetic Peripheral Neuropathy. European Neurology, 1999; 41: 27-34.

77. Rozanska O, Uruska A, Zozulinska-Ziolkiewicz D. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Diabetes. International Journal of Molecular Sciences, 2020; 21: 841.

78. Apfel SC. Neurotrophic factors in the therapy of diabetic neuropathy. American Journal of Medicine, 1999; 107: 34s-42s.

79. Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. Journal of Cell Science, 2003; 116: 1647-8.

80. Huang GT. Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. Regenerative Medicine, 2009; 4: 697-707.

81. Kuttler Y. Classification of dentine into primary, secondary, and tertiary. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, 1959; 12: 996-1001.

82. Smith AJ, Cassidy N, Hb P, Bègue-Kirn C, Ruch J, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. International Journal of Developmental Biology, 1995; 39: 273-80.

83. Garber SE, Shabahang S, Escher AP, Torabinejad M. The Effect of Hyperglycemia on Pulpal Healing in Rats. Journal of Endodontics, 2009; 35: 60-2.

84. Tjäderhane L, Hietala E-L, Larmas M. Reduction in dentine apposition in rat molars by a high-sucrose diet. Archives of Oral Biology, 1994; 39: 491-5.

85. Tjäderhane L, Hakala P, Mattila P, Svanberg M, Larmas M. Effect of xylitol on dentin formation in molars of adult rats. European Journal of Oral Sciences, 1996; 104: 409-11.

86. Hietala E-L, Larmas M. Evidence that High-sucrose Diet Reduces Dentin Formation and Disturbs Mineralization in Rat Molars. Journal of Dental Research, 1995; 74: 1899-903.

87. Valikangas L, Pekkala E, Larmas M, Risteli J, Salo T, Tjaderhane L. The effects of high levels of glucose and insulin on type I collagen synthesis in mature human odontoblasts and pulp tissue in vitro. Advances in Dental Research, 2001; 15: 72-5.

88. Lee YH, Kim HS, Kim JS, Yu MK, Cho SD, Jeon JG, Yi HK. C-myb Regulates Autophagy for Pulp Vitality in Glucose Oxidative Stress. Journal of Dental Research, 2016; 95: 430-8.

89. Ilic J, Radovic K, Roganovic J, Brkovic B, Stojic D. The levels of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein 2 in dental pulp tissue of healthy and diabetic patients. Journal of Endodontics, 2012; 38: 764-8.

90. Russell BG. The dental pulp in diabetes mellitus. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica, 1967; 70: 319-20.

91. Inagaki Y, Yoshida K, Ohba H, Seto H, Kido J, Haneji T, Nagata T. High glucose levels increase osteopontin production and pathologic calcification in rat dental pulp tissues. Journal of Endodontics, 2010; 36: 1014-20.

92. Amatyakul S, Chakraphan D, Chotpaibulpan S, Patumraj S. The effect of long-term supplementation of vitamin C on pulpal blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. Clinical Hemorheology and Microcirculation, 2003; 29: 313-9.

93. Zhao Y, Wieman HL, Jacobs SR, Rathmell JC. Mechanisms and methods in glucose metabolism and cell death. Methods in Enzymology, 2008; 442: 439-57.

94. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. Saudi Pharmaceutical Journal, 2016; 24: 547-53.

95. Kaiser N, Sasson S, Feener EP, Boukobza-Vardi N, Higashi S, Moller DE, Davidheiser S, Przybylski RJ, King GL. Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. Diabetes, 1993; 42: 80-9.

96. Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. The missing link: A single unifying mechanism for diabetic complications. Kidney International, 2000; 58: S26-S30.

97. Giacco F, Brownlee M, Schmidt AM. Oxidative Stress and Diabetic Complications. Circulation Research, 2010; 107: 1058-70.

98. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. Diabetes, 2005; 54: 1615-25.

99. Chan L, Terashima T, Fujimiya M, Kojima H. Chronic diabetic complications: the body's adaptive response to hyperglycemia gone awry? Transactions of the American Clinical and Climatological Association, 2006.;117: 341-52.

100. Lee AY, Chung SK, Chung SS. Demonstration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing the aldose reductase gene in the lens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995; 92: 2780-4.

101. Chung SSM, Ho ECM, Lam KSL, Chung SK. Contribution of Polyol Pathway to Diabetes-Induced Oxidative Stress. Journal of the American Society of Nephrology, 2003; 14: S233-S6.

102. Cheng HM, Gonzalez RG. The effect of high glucose and oxidative stress on lens metabolism, aldose reductase, and senile cataractogenesis. Metabolism, 1986; 35: 10-4.

103. Shinohara M, Thornalley PJ, Giardino I, Beisswenger P, Thorpe SR, Onorato J, Brownlee M. Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. The Journal of Clinical Investigation, 1998; 101: 1142-7.

104. Charonis AS, Reger LA, Dege JE, Kouzi-Koliakos K, Furcht LT, Wohlhueter RM, Tsilibary EC. Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation. Diabetes, 1990; 39: 807-14.

105. Abordo EA, Thornalley PJ. Synthesis and secretion of tumour necrosis factor-alpha by human monocytic THP-1 cells and chemotaxis induced by human serum albumin derivatives modified with methylglyoxal and glucose-derived advanced glycation endproducts. Immunology Letters, 1997; 58: 139-47.

106. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. Diabetes, 1998; 47: 859-66.

107. Takagi C, Bursell SE, Lin YW, Takagi H, Duh E, Jiang Z, Clermont AC, King GL. Regulation of retinal hemodynamics in diabetic rats by increased expression and action of endothelin-1. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1996; 37: 2504-18.

108. Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ, King GL. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. Circulation, 2000; 101: 676-81.

109. Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli LG, Sesti G, Lauro R. Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. Circulation, 2002; 106: 466-72.

110. Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked β-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. Nature, 2007; 446: 1017-22.

111. Beleznai T, Bagi Z. Activation of hexosamine pathway impairs nitric oxide (NO)-dependent arteriolar dilations by increased protein O-GlcNAcylation. Vascular Pharmacology, 2012; 56: 115-21.

112. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. Journal of Clinical Pathology, 2001; 54: 176-86.

113. Rhee SG. Cell signaling. H2O2, a necessary evil for cell signaling. Science, 2006; 312: 1882-3.

114. Kołodziej U, Maciejczyk M, Miąsko A, Matczuk J, Knaś M, Żukowski P, Żendzian-Piotrowska M, Borys J, Zalewska A. Oxidative Modification in the Salivary Glands of High Fat-Diet Induced Insulin Resistant Rats. Frontiers in Physiology, 2017; 8: 20.

115. Fakhruddin S, Alanazi W, Jackson KE. Diabetes-Induced Reactive Oxygen Species: Mechanism of Their Generation and Role in Renal Injury. Journal of Diabetes Research, 2017; 2017: 8379327.

116. Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. Nitric Oxide, 2010; 23: 75-93.

117. Moncada S, Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. Handbook of Experimental Pharmacology, 2006; 213-54.

118. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. European Heart Journal, 2012; 33: 829-37d.

119. Mori M, Gotoh T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000; 275: 715-9.

120. Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. The Journal of Pathology, 2000; 190: 244-54.

121. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. Cell, 1994; 78: 915-8.

122. Stadler K. Peroxynitrite-driven mechanisms in diabetes and insulin resistance - the latest advances. Current Medicinal Chemistry, 2011; 18: 280-90.

123. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. Journal of Pineal Research, 2004; 36: 1-9.

124. Kowluru RA, Atasi L, Ho Y-S. Role of Mitochondrial Superoxide Dismutase in the Development of Diabetic Retinopathy. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2006; 47: 1594-9.

125. Sena CM, Leandro A, Azul L, Seiça R, Perry G. Vascular Oxidative Stress: Impact and Therapeutic Approaches. Frontiers in Physiology, 2018; 9: 1668-.

126. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. Nature, 2000; 404: 787-90.

127. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. Cell, 2008; 132: 344-62.

128. Baeuerle PA, Baltimore D. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. Science, 1988; 242: 540-6.

129. Munemasa T, Mukaibo T, Kondo Y, Masaki C, Kusuda Y, Miyagi Y, Tsuka S, Hosokawa R, Nakamoto T. Salivary gland hypofunction in KK-Ay type 2 diabetic mice. Journal of Diabetes, 2018; 10: 18-27.

130. Ittichaicharoen J, Apaijai N, Tanajak P, Sa-Nguanmoo P, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Impaired mitochondria and intracellular calcium transients in the salivary glands of obese rats. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism 2017; 42: 420-9.

131. Nogueira FN, Carvalho AM, Yamaguti PM, Nicolau J. Antioxidant parameters and lipid peroxidation in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. Clinica Chimica Acta, 2005; 353: 133-9.

132. Zalewska A, Knaś M, Żendzian-Piotrowska M, Waszkiewicz N, Szulimowska J, Prokopiuk S, Waszkiel D, Car H. Antioxidant profile of salivary glands in high fat diet-induced insulin resistance rats. Oral Diseases, 2014; 20: 560-6.

133. Knaś M, Maciejczyk M, Daniszewska I, Klimiuk A, Matczuk J, Kołodziej U, Waszkiel D, Ładny JR, Żendzian-Piotrowska M, Zalewska A. Oxidative Damage to the Salivary Glands of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes-Temporal Study: Oxidative Stress and Diabetic Salivary Glands. Journal of Diabetes Research, 2016; 2016: 4583742.

134. Solinas G, Karin M. JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. The Federation of American Societies for Experimental Biology, 2010; 24: 2596-611.

135. Shikama Y, Ishimaru N, Kudo Y, Bando Y, Aki N, Hayashi Y, Funaki M. Effects of Free Fatty Acids on Human Salivary Gland Epithelial Cells. Journal of Dental Research, 2013; 92: 540-6.

136. Witcher D, Sakai N, Williams B, Rahimian R, Anderson L. Gender differences in the effects of streptozotocin-induced diabetes on parasympathetic vasodilatation in the rat submandibular gland. Archives of Oral Biology, 2010; 55: 745-53.

137. Leite MF, Ganzerla E, Marques MM, Nicolau J. Diabetes Induces Metabolic Alterations in Dental Pulp. Journal of Endodontics, 2008; 34: 1211-4.

138. Nakajima Y, Inagaki Y, Hiroshima Y, Kido J, Nagata T. Advanced glycation end-products enhance calcification in cultured rat dental pulp cells. Journal of Endodontics, 2013; 39: 873-8.

139. Nakajima Y, Inagaki Y, Kido J, Nagata T. Advanced glycation end products increase expression of S100A8 and A9 via RAGE-MAPK in rat dental pulp cells. Oral Diseases, 2015; 21: 328-34.

140. Leite MF, De Lima A, Massuyama MM, Otton R. In vivo astaxanthin treatment partially prevents antioxidant alterations in dental pulp from alloxan-induced diabetic rats. International Endodontic Journal, 2010; 43: 959-67.

141. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. Genes and Development, 2009; 23: 781-3.

142. Waterland RA. Epigenetic mechanisms and gastrointestinal development. The Journal of Pediatrics, 2006; 149: S137-S42.

143. Hardeland R. Melatonin, noncoding RNAs, messenger RNA stability and epigenetics--evidence, hints, gaps and perspectives. International Journal of Molecular Sciences, 2014; 15: 18221-52.

144. Henikoff S, Shilatifard A. Histone modification: cause or cog? Trends in Genetics, 2011; 27: 389-96.

145. Gibney ER, Nolan CM. Epigenetics and gene expression. Heredity, 2010; 105: 4-13.

146. Nafee TM, Farrell WE, Carroll WD, Fryer AA, Ismail KM. Epigenetic control of fetal gene expression. BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology, 2008; 115: 158-68.

147. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. Carcinogenesis, 2010; 31: 27-36.

148. Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, Crofford O, Davis M, Rand L, Siebert C. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. New England Journal of Medicine, 1993; 329: 977-86.

149. Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Woodward M, Marre M, Cooper M, Glasziou P, Grobbee D, Hamet P, Harrap S, Heller S, Liu L, Mancia G, Mogensen CE, Pan C, Poulter N, Rodgers A, Williams B, Bompoint S, de Galan BE, Joshi R, Travert F. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. New England Journal of Medicine, 2008; 358: 2560-72.

150. Engerman RL, Kern TS. Progression of incipient diabetic retinopathy during good glycemic control. Diabetes, 1987; 36: 808-12.

151. El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, Pocai A, Jones PL, Roeder RG, Cooper ME, Brownlee M. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. The Journal of Experimental Medicine, 2008; 205: 2409-17.

152. Reddy MA, Zhang E, Natarajan R. Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory. Diabetologia, 2015; 58: 443-55.

153. Jin J, Wang X, Zhi X, Meng D. Epigenetic regulation in diabetic vascular complications. Journal of Molecular Endocrinology, 2019; 63: R103-R15.

154. Villeneuve LM, Reddy MA, Lanting LL, Wang M, Meng L, Natarajan R. Epigenetic histone H3 lysine 9 methylation in metabolic memory and inflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells in diabetes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008; 105: 9047-52.

155. Metzger E, Wissmann M, Yin N, Müller JM, Schneider R, Peters AHFM, Günther T, Buettner R, Schüle R. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. Nature, 2005; 437: 436-9.

156. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. Journal of the American Chemical Society, 1958; 80: 2587.

157. McCord CP, Allen FP. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. Journal of Experimental Zoology, 1917; 23: 207-24.

158. Sugden D, Davidson K, Hough KA, Teh MT. Melatonin, melatonin receptors and melanophores: a moving story. Pigment Cell Research, 2004; 17: 454-560.

159. Tarocco A, Caroccia N, Morciano G, Wieckowski MR, Ancora G, Garani G, Pinton P. Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care. Cell Death & Disease, 2019; 10: 317.

160. Manchester LC, Poeggeler B, Alvares FL, Ogden GB, Reiter RJ. Melatonin immunoreactivity in the photosynthetic prokaryote Rhodospirillum rubrum: implications for an ancient antioxidant system. Cellular and Molecular Biology, 1995; 41: 391-5.

161. Zhao D, Yu Y, Shen Y, Liu Q, Zhao Z, Sharma R, Reiter RJ. Melatonin Synthesis and Function: Evolutionary History in Animals and Plants. Frontiers in Endocrinology, 2019; 10: 249.

162. Antolin I, Obst B, Burkhardt S, Hardeland R. Antioxidative protection in a high-melatonin organism: the dinoflagellate Gonyaulax polyedra is rescued from lethal oxidative stress by strongly elevated, but physiologically possible concentrations of melatonin. Journal of Pineal Research, 1997; 23: 182-90.

163. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M, Calvo JR. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. Biol Signals Recept, 2000; 9: 137-59.

164. Arendt J. Importance and Relevance of Melatonin to Human Biological Rhythms. Journal of Neuroendocrinology, 2003; 15: 427-31.

165. Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. Pharmacological Reports, 2009; 61: 383-410.

166. Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C, Reiter RJ. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. Journal of Neuroimmunology, 2005; 165: 139-49.

167. Chen Y, Zhang J, Zhao Q, Chen Q, Sun Y, Jin Y, Wu J. Melatonin Induces Anti-Inflammatory Effects to Play a Protective Role via Endoplasmic Reticulum Stress in Acute Pancreatitis. Cellular Physiology and Biochemistry, 2016; 40: 1094-104.

168. Suzuki N, Somei M, Seki A, Reiter RJ, Hattori A. Novel bromomelatonin derivatives as potentially effective drugs to treat bone diseases. Journal of Pineal Research, 2008; 45: 229-34.

169. Liu J, Huang F, He H-W. Melatonin effects on hard tissues: bone and tooth. International Journal of Molecular Sciences, 2013; 14: 10063-74.

170. Cipolla-Neto J, Amaral FG, Afeche SC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. Journal of Pineal Research, 2014; 56: 371-81.

171. Hill SM, Frasch T, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, Mao L. Molecular mechanisms of melatonin anticancer effects. Integrative Cancer Therapies, 2009; 8: 337-46.

172. Comai S, Gobbi G. Unveiling the role of melatonin MT2 receptors in sleep, anxiety and other neuropsychiatric diseases: a novel target in psychopharmacology. Journal of Psychiatry and Neuroscience, 2014; 39: 6-21.

173. Hardeland R. Melatonin in aging and disease -multiple consequences of reduced secretion, options and limits of treatment. Aging and Disease, 2012; 3: 194-225.

174. Bazil CW, Short D, Crispin D, Zheng W. Patients with intractable epilepsy have low melatonin, which increases following seizures. Neurology, 2000; 55: 1746-8.

175. Golan J, Torres K, Staskiewicz GJ, Opielak G, Maciejewski R. Morphometric parameters of the human pineal gland in relation to age, body weight and height. Folia Morphologica, 2002; 61: 111-3.

176. Moller M, Baeres FM. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. Cell and Tissue Research, 2002; 309: 139-50.

177. Ackermann K, Stehle JH. Melatonin synthesis in the human pineal gland: advantages, implications, and difficulties. Chronobiology International, 2006; 23: 369-79.

178. Tricoire H, Locatelli A, Chemineau P, Malpaux B. Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. Endocrinology, 2002; 143: 84-90.

179. Schenker S, Yang Y, Perez A, Acuff RV, Papas AM, Henderson G, Lee MP. Antioxidant transport by the human placenta. Clinical Nutrition, 1998; 17: 159-67.

180. Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. Experientia, 1993; 49: 654-64.

181. Zhdanova IV, Wurtman RJ, Balcioglu A, Kartashov AI, Lynch HJ. Endogenous Melatonin Levels and the Fate of Exogenous Melatonin: Age Effects. The Journals of Gerontology: Series A, 1998; 53A: B293-B8.

182. Morin D, Simon N, Depres-Brummer P, Levi F, Tillement JP, Urien S. Melatonin high-affinity binding to alpha-1-acid glycoprotein in human serum. Pharmacology, 1997; 54: 271-5.

183. Acuna-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Diaz-Casado ME, Lima-Cabello E, Lopez LC, Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. Cellular and Molecular Life Sciences, 2014; 71: 2997-3025.

184. Suofu Y, Li W, Jean-Alphonse FG, Jia J, Khattar NK. Dual role of mitochondria in producing melatonin and driving GPCR signaling to block cytochrome c release. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017; 114: E7997-E8006.

185. Reiter RJ, Rosales-Corral S, Tan DX, Jou MJ, Galano A, Xu B. Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas. Cellular and Molecular Life Sciences, 2017; 74: 3863-81.

186. Huether G. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. Experientia, 1993; 49: 665-70.

187. Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. Journal of Pineal Research, 2003; 34: 75-8.

188. Suofu Y, Li W, Jean-Alphonse FG, Jia J, Khattar NK, Li J, Baranov SV, Leronni D, Mihalik AC, He Y, Cecon E, Wehbi VL, Kim J, Heath BE, Baranova OV, Wang X, Gable MJ, Kretz ES, Di Benedetto G, Lezon TR, Ferrando LM, Larkin TM, Sullivan M, Yablonska S, Wang J, Minnigh MB, Guillaumet G, Suzenet F, Richardson RM, Poloyac SM, Stolz DB, Jockers R, Witt-Enderby PA, Carlisle DL, Vilardaga J-P, Friedlander RM. Dual role of mitochondria in producing melatonin and driving GPCR signaling to block cytochrome c release. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017; 114: E7997-E8006.

189. Liu L, Labani N, Cecon E, Jockers R. Melatonin Target Proteins: Too Many or Not Enough? Frontiers in Endocrinology, 2019; 10: 791.

190. Jockers R, Delagrange P, Dubocovich ML, Markus RP, Renault N, Tosini G, Cecon E, Zlotos DP. Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. British Journal of Pharmacology, 2016; 173: 2702-25.

191. von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. Cell and Tissue Research, 2002; 309: 151-62.

192. Cecon E, Oishi A, Jockers R. Melatonin receptors: molecular pharmacology and signalling in the context of system bias. British Journal of Pharmacology, 2018; 175: 3263-80.

193. Kopustinskiene DM, Bernatoniene J. Molecular Mechanisms of Melatonin-Mediated Cell Protection and Signaling in Health and Disease. Pharmaceutics, 2021; 13: 129.

194. Hardeland R. Melatonin Metabolism in the Central Nervous System. Current Neuropharmacology, 2010; 8: 168-81.

195. Andersen LPH, Werner MU, Rosenkilde MM, Harpsøe NG, Fuglsang H, Rosenberg J, Gögenur I. Pharmacokinetics of oral and intravenous melatonin in healthy volunteers. BMC Pharmacology and Toxicology, 2016; 17: 8.

196. Hardeland R. Taxon- and Site-Specific Melatonin Catabolism. Molecules, 2017; 22: 2015.

197. Tobin D, Zmijewski M, Wortsman J, Paus R. Melatonin in the skin: Synthesis, metabolism and functions. Trends in Endocrinology and Metabolism, 2008; 19: 17-24.

198. Shimozuma M, Tokuyama R, Tatehara S, Umeki H, Ide S, Mishima K, Saito I, Satomura K. Expression and cellular localizaion of melatonin-synthesizing enzymes in rat and human salivary glands. Histochemistry and Cell Biology, 2011. 135: 389-96.

199. Isola M, Lilliu MA. Melatonin localization in human salivary glands. Journal of Oral Pathology and Medicine, 2016; 45: 510-5.

200. Laakso ML, Porkka-Heiskanen T, Alila A, Stenberg D, Johansson G. Correlation between salivary and serum melatonin: dependence on serum melatonin levels. Journal of Pineal Research, 1990; 9: 39-50.

201. Cardinali DP, Lynch HJ, Wurtman RJ. Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. Endocrinology, 1972; 91: 1213-8.

202. Cutando A, Galindo P, Gómez-Moreno G, Arana C, Bolaños J, Acuña-Castroviejo D, Wang HL. Relationship between salivary melatonin and severity of periodontal disease. Journal of Periodontology, 2006; 77: 1533-8.

203. Srinath R, Acharya AB, Thakur SL. Salivary and Gingival Crevicular Fluid Melatonin in Periodontal Health and Disease. Journal of Periodontology, 2010; 81: 277-83.

204. Arias-Santiago S, Aneiros-Fernandez J, Arias-Santiago B, Giron-Prieto MS, Caba-Molina M, Lopez-Valverde A, Aneiros-Cachaza J, Campos A, Cutando A. MTNR1A receptor expression in normal and pathological human salivary glands. Anticancer Research, 2012; 32: 4765-71.

205. Cevik-Aras H, Godoy T, Ekstrom J. Melatonin-induced protein synthesis in the rat parotid gland. Journal of Physiology and Pharmacology, 2011; 62: 95-9.

206. Aras HC, Ekström J. Melatonin-evoked in vivo secretion of protein and amylase from the parotid gland of the anaesthetised rat. Journal of Pineal Research, 2008; 45: 413-21.

207. Kumasaka S, Shimozuma M, Kawamoto T, Mishima K, Tokuyama R, Kamiya Y, Davaadorj P, Saito I, Satomura K. Possible involvement of melatonin in tooth development: expression of melatonin 1a receptor in human and mouse tooth germs. Histochemistry and Cell Biology, 2010; 133: 577-84.

208. Tao J, Zhai Y, Park H, Han J, Dong J, Xie M, Gu T, Lewi K, Ji F, Jia W. Circadian Rhythm Regulates Development of Enamel in Mouse Mandibular First Molar. PloS One, 2016; 11: e0159946-e.

209. Boga JA, Coto-Montes A, Rosales-Corral SA, Tan D-X, Reiter RJ. Beneficial actions of melatonin in the management of viral infections: a new use for this “molecular handyman”? Reviews in Medical Virology, 2012; 22: 323-38.

210. Czesnikiewicz-Guzik M, Konturek SJ, Loster B, Wisniewska G, Majewski S. Melatonin and its role in oxidative stress related diseases of oral cavity. Journal of Physiology and Pharmacology, 2007; 58: 5-19.

211. Cengiz Mİ, Cengiz S, Wang H-L. Melatonin and Oral Cavity. International Journal of Dentistry, 2012; 2012: 491872.

212. Nakamura E, Kozaki K-i, Tsuda H, Suzuki E, Pimkhaokham A, Yamamoto G, Irie T, Tachikawa T, Amagasa T, Inazawa J, Imoto I. Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor 1 A (MTNR1A) in oral squamous-cell carcinoma. Cancer Science, 2008; 99: 1390-400.

213. Yeh C-M, Lin C-W, Yang J-S, Yang W-E, Su S-C, Yang S-F. Melatonin inhibits TPA-induced oral cancer cell migration by suppressing matrix metalloproteinase-9 activation through the histone acetylation. Oncotarget, 2016; 7: 21952-67.

214. Ortiz F, Acuña-Castroviejo D, Doerrier C, Dayoub JC, López LC, Venegas C, García JA, López A, Volt H, Luna-Sánchez M, Escames G. Melatonin blunts the mitochondrial/NLRP3 connection and protects against radiation-induced oral mucositis. Journal of Pineal Research, 2015; 58: 34-49.

215. Takechi M, Tatehara S, Satomura K, Fujisawa K, Nagayama M. Effect of FGF-2 and melatonin on implant bone healing: a histomorphometric study. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2008; 19: 2949-52.

216. Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Muñoz F, Lopez-Peña M, Stephenson J, Reiter RJ. Melatonin stimulates osteointegration of dental implants. Journal of Pineal Research, 2008; 45: 174-9.

217. El-Gammal MY, Salem AS, Anees MM, Tawfik MA. Clinical and Radiographic Evaluation of Immediate Loaded Dental Implants With Local Application of Melatonin: A Preliminary Randomized Controlled Clinical Trial. Journal of Oral Implantology, 2016; 42: 119-25.

218. Cutando A, Gomez-Moreno G, Arana C, Acuna-Castroviejo D, Reiter RJ. Melatonin: potential functions in the oral cavity. Journal of Periodontology, 2007; 78: 1094-102.

219. Choi EY, Jin JY, Lee JY, Choi JI, Choi IS, Kim SJ. Melatonin inhibits Prevotella intermedia lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and interleukin-6 in murine macrophages by suppressing NF-κB and STAT1 activity. Journal of Pineal Research, 2011; 50: 197-206.

220. Cutando A, López-Valverde A, de Diego RG, de Vicente J, Reiter R, Fernández MH, Ferrera MJ. Effect of topical application of melatonin to the gingiva on salivary osteoprotegerin, RANKL and melatonin levels in patients with diabetes and periodontal disease. Odontology, 2014; 102: 290-6.

221. Cutando A, López-Valverde A, Gómez-de-Diego R, Arias-Santiago S, de Vicente-Jiménez J. Effect of gingival application of melatonin on alkaline and acid phosphatase, osteopontin and osteocalcin in patients with diabetes and periodontal disease. Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal, 2013; 18: e657-e63.

222. Arabacı T, Kermen E, Özkanlar S, Köse O, Kara A, Kızıldağ A, Duman Ş B, Ibişoğlu E. Therapeutic Effects of Melatonin on Alveolar Bone Resorption After Experimental Periodontitis in Rats: A Biochemical and Immunohistochemical Study. Journal of Periodontology, 2015; 86: 874-81.

223. Liu J, Zhou H, Fan W, Dong W, Fu S, He H, Huang F. Melatonin influences proliferation and differentiation of rat dental papilla cells in vitro and dentine formation in vivo by altering mitochondrial activity. Journal of Pineal Research, 2013; 54: 170-8.

224. Liu Q, Fan W, He Y, Zhang F, Guan X, Deng Q, Lu X, He H, Huang F. Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of human dental pulp cells. Archives of Oral Biology, 2017; 83: 33-9.

225. Guerrero-Gironés J, Alcaina-Lorente A, Ortiz-Ruiz C, Ortiz-Ruiz E, Pecci-Lloret MP, Rodríguez-Lozano FJ, Martínez CM, Ortiz-Ruiz AJ. Melatonin as an Agent for Direct Pulp-Capping Treatment. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020; 17: 1043.

226. O'Brien IAD, Lewin IG, O'Hare JP, Arendt J, Corrall RJM. Abnormal circadian rhythm of melatonin in diabetic autonomic neuropathy Clinical Endocrinology, 1986; 24: 359-64.

227. Hikichi T, Tateda N, Miura T. Alteration of melatonin secretion in patients with type 2 diabetes and proliferative diabetic retinopathy. Clinical Ophthalmology, 2011; 5: 655-60.

228. Frese T, Bach AG, Muhlbauer E, Ponicke K, Bromme HJ, Welp A, Peschke E. Pineal melatonin synthesis is decreased in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. Life Sciences, 2009; 85: 526-33.

229. Reina M, Martínez A. A new free radical scavenging cascade involving melatonin and three of its metabolites (3OHM, AFMK and AMK). Computational and Theoretical Chemistry, 2018; 1123: 111-8.

230. Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. Life Science, 1994; 55: PL455-PL60.

231. Maiocchi SL, Morris JC, Rees MD, Thomas SR. Regulation of the nitric oxide oxidase activity of myeloperoxidase by pharmacological agents. Biochemical Pharmacology, 2017; 135: 90-115.

232. Swiderska-Kołacz G, Klusek J, Kołataj A. The effect of melatonin on glutathione and glutathione transferase and glutathione peroxidase activities in the mouse liver and kidney in vivo. Neuro Endocrinology Letters, 2006; 27: 365-8.

233. Winiarska K, Fraczyk T, Malinska D, Drozak J, Bryla J. Melatonin attenuates diabetes-induced oxidative stress in rabbits. Journal of Pineal Research, 2006; 40: 168-76.

234. Salido EM, Bordone M, De Laurentiis A, Chianelli M, Keller Sarmiento MI, Dorfman D, Rosenstein RE. Therapeutic efficacy of melatonin in reducing retinal damage in an experimental model of early type 2 diabetes in rats. Journal of Pineal Research, 2013; 54: 179-89.

235. Jiang T, Chang Q, Cai J, Fan J, Zhang X, Xu G. Protective Effects of Melatonin on Retinal Inflammation and Oxidative Stress in Experimental Diabetic Retinopathy. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016; 2016: 3528274.

236. Lai T-T, Yang C-M, Yang C-H. Astaxanthin Protects Retinal Photoreceptor Cells against High Glucose-Induced Oxidative Stress by Induction of Antioxidant Enzymes via the PI3K/Akt/Nrf2 Pathway. Antioxidants, 2020; 9: 729.

237. Negi G, Kumar A, Sharma SS. Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy: effects on NF-kappaB and Nrf2 cascades. Journal of Pineal Research, 2011; 50: 124-31.

238. Wang S, Zhao Z, Feng X, Cheng Z, Xiong Z, Wang T, Lin J, Zhang M, Hu J, Fan Y, Reiter RJ, Wang H, Sun D. Melatonin activates Parkin translocation and rescues the impaired mitophagy activity of diabetic cardiomyopathy through Mst1 inhibition. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2018; 22: 5132-44.

239. Onphachanh X, Lee HJ, Lim JR, Jung YH, Kim JS, Chae CW, Lee S-J, Gabr AA, Han HJ. Enhancement of high glucose-induced PINK1 expression by melatonin stimulates neuronal cell survival: Involvement of MT2/Akt/NF-κB pathway. Journal of Pineal Research, 2017; 63: e12427.

240. Stetinova V, Smetanova L, Grossmann V, Anzenbacher P. In vitro and in vivo assessment of the antioxidant activity of melatonin and related indole derivatives. General Physiology and Biophysics, 2002; 21: 153-62.

241. Yavuz O, Cam M, Bukan N, Guven A, Silan F. Protective effect of melatonin on beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetes in rats. Acta Histochemica, 2003; 105: 261-6.

242. Korkmaz A, Rosales-Corral S, Reiter R. Gene regulation by melatonin linked to epigenetic phenomena. Gene, 2012; 503: 1-11.

243. Deng WG, Tang ST, Tseng HP, Wu KK. Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding. Blood, 2006; 108: 518-24.

244. Delpino FM, Figueiredo LM, Nunes BP. Effects of melatonin supplementation on diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. Clinical Nutrition, 2021; 40: 4595-605.

245. Cutando A, Gomez-Moreno G, Villalba J, Ferrera MJ, Escames G, Acuna-Castroviejo D. Relationship between salivary melatonin levels and periodontal status in diabetic patients. Jourmal of Pineal Research, 2003; 35: 239-44.

246. Handelsman Y, Bloomgarden ZT, Grunberger G, Umpierrez G, Zimmerman RS, Bailey TS, Blonde L, Bray GA, Cohen AJ, Dagogo-Jack S, Davidson JA, Einhorn D, Ganda OP, Garber AJ, Garvey WT, Henry RR, Hirsch IB, Horton ES, Hurley DL, Jellinger PS, Jovanovič L, Lebovitz HE, LeRoith D, Levy P, McGill JB, Mechanick JI, Mestman JH, Moghissi ES, Orzeck EA, Pessah-Pollack R, Rosenblit PD, Vinik AI, Wyne K, Zangeneh F. American association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology - clinical practice guidelines for developing a diabetes mellitus comprehensive care plan - 2015. Endocrine Practice, 2015; 21: 1-87.

247. Berridge MV, Herst PM, Tan AS, Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. Biotechnology Annual Review, 2005; 127-52.

248. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. Nature Protocols, 2008; 3: 1125-31.

249. Abdolsamadi H, Goodarzi MT, Ahmadi Motemayel F, Jazaeri M, Feradmal J, Zarabadi M, Hoseyni M, Torkzaban P. Reduction of Melatonin Level in Patients with Type II Diabetes and Periodontal Diseases. Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects, 2014; 8: 160-5.

250. Tutuncu NB, Batur MK, Yildirir A, Tutuncu T, Deger A, Koray Z, Erbas B, Kabakci G, Aksoyek S, Erbas T. Melatonin levels decrease in type 2 diabetic patients with cardiac autonomic neuropathy. Journal of Pineal Research, 2005; 39: 43-9.

251. Wan WC, Long Y, Wan WW, Liu HZ, Zhang HH, Zhu W. Plasma melatonin levels in patients with diabetic retinopathy secondary to type 2 diabetes. World Journal of Diabetes, 2021; 12: 138-48.

252. Pang SF, Tang F, Tang PL. Alloxan-induced diabetes and the pineal gland: differential effects on the levels of pineal N-acetylserotonin, pineal melatonin, and serum melatonin. Journal of Pineal Research, 1985; 2: 79-85.

253. Stebelová K, Herichová I, Zeman M. Diabetes induces changes in melatonin concentrations in peripheral tissues of rat. Neuro Endocrinology Letters, 2007; 28: 159-65.

254. Bach AG, Mühlbauer E, Peschke E. Adrenoceptor Expression and Diurnal Rhythms of Melatonin and Its Precursors in the Pineal Gland of Type 2 Diabetic Goto-Kakizaki Rats. Endocrinology, 2010; 151: 2483-93.

255. Peschke E, Frese T, Chankiewitz E, Peschke D, Preiss U, Schneyer U, Spessert R, Muhlbauer E. Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. Journal of Pineal Research, 2006; 40: 135-43.

256. Zheng L, Du Y, Miller C, Gubitosi-Klug RA, Kern TS, Ball S, Berkowitz BA. Critical role of inducible nitric oxide synthase in degeneration of retinal capillaries in mice with streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia, 2007; 50: 1987-96.

257. Isola M, Lilliu MA, Loy F, Isola R. Diabetic Status Influences the Storage of Melatonin in Human Salivary Glands. The Anatomical Record, 2018; 301: 711-6.

258. Loy F, Isola M, Isola R, Solinas P, Lilliu MA, Puxeddu R, Ekstrom J. Ultrastructural evidence of a secretory role for melatonin in the human parotid gland. Journal of Physiology and Pharmacology, 2015; 66: 847-53.

259. Dworzański J, Strycharz-Dudziak M, Kliszczewska E, Kiełczykowska M, Dworzańska A, Drop B, Polz-Dacewicz M. Glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) activity in patients with diabetes mellitus type 2 infected with Epstein-Barr virus. PloS One, 2020; 15: e0230374.

260. Fujii J, Myint T, Okado A, Kaneto H, Taniguchi N. Oxidative stress caused by glycation of Cu,Zn-superoxide dismutase and its effects on intracellular components. Nephrology Dialysis Transplantation, 1996; 11: 34-40.

261. Gale Z, Cooper PR, Scheven BA. Effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on dental pulp cells. Journal of Dental Research, 2011; 90: 1240-5.

262. de Vicente JC, Cabo R, Ciriaco E, Laura R, Naves FJ, Silos-Santiago I, Vega JA. Impaired dental cytodifferentiation in glial cell-line derived growth factor (GDNF) deficient mice. Annals of Anatomy, 2002; 184: 85-92.

263. Samadian Z, Tofighi A, Razi M, Ghaderi Pakdel F, Tolouei Azar J. Effect of moderate-intensity exercise training on GDNF signaling pathway in testicles of rats after experimental diabetes type 1 induction. Diabetes Research and Clinical Practice, 2020; 167: 108332.

264. Anitha M, Gondha C, Sutliff R, Parsadanian A, Mwangi S, Sitaraman SV, Srinivasan S. GDNF rescues hyperglycemia-induced diabetic enteric neuropathy through activation of the PI3K/Akt pathway. The Journal of Clinical Investigation, 2006; 116: 344-56.

265. Mwangi S, Anitha M, Mallikarjun C, Ding X, Hara M, Parsadanian A, Larsen CP, Thule P, Sitaraman SV, Anania F, Srinivasan S. Glial cell line-derived neurotrophic factor increases beta-cell mass and improves glucose tolerance. Gastroenterology, 2008; 134: 727-37.

266. Boss JD, Singh PK, Pandya HK, Tosi J, Kim C, Tewari A, Juzych MS, Abrams GW, Kumar A. Assessment of Neurotrophins and Inflammatory Mediators in Vitreous of Patients With Diabetic Retinopathy. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 2017; 58: 5594-603.

267. Hashimoto M, Nitta A, Fukumitsu H, Nomoto H, Shen L, Furukawa S. Inflammation-induced GDNF improves locomotor function after spinal cord injury. Neuroreport, 2005; 16: 99-102.

268. Purwata TE. High TNF-alpha plasma levels and macrophages iNOS and TNF-alpha expression as risk factors for painful diabetic neuropathy. Journal of Pain Research, 2011; 4: 169-75.

269. Fujimoto M, Shimizu N, Kunii K, Martyn JAJ, Ueki K, Kaneki M. A Role for iNOS in Fasting Hyperglycemia and Impaired Insulin Signaling in the Liver of Obese Diabetic Mice. Diabetes, 2005; 54: 1340-8.

270. Qi J, Wu Q, Cheng Q, Chen X, Zhu M, Miao C. High Glucose Induces Endothelial COX2 and iNOS Expression via Inhibition of Monomethyltransferase SETD8 Expression. Journal of Diabetes Research, 2020; 2020: 1-10.

271. Di Nardo Di Maio F, Lohinai Z, D'Arcangelo C, De Fazio PE, Speranza L, De Lutiis MA, Patruno A, Grilli A, Felaco M. Nitric oxide synthase in healthy and inflamed human dental pulp. Journal of Dental Research, 2004; 83: 312-6.

272. Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FB, Erzurum SC. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995; 92: 7809-13.

273. Honing ML, Morrison PJ, Banga JD, Stroes ES, Rabelink TJ. Nitric oxide availability in diabetes mellitus. Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 1998; 14: 241-9.

274. Roganovic J, Djukic LJ, Krsljak E, Tanic N, Stojic D. Reduced muscarinic parotid secretion is underlain by impaired NO signaling in diabetic rabbits. Oral Diseases, 2015; 21: 634-40.

275. Lomniczi A, Mohn C, Faletti A, Franchi A, McCann SM, Rettori V, Elverdin JC. Inhibition of salivary secretion by lipopolysaccharide: possible role of prostaglandins. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2001; 281: E405-E11.

276. Maeda H. Aging and Senescence of Dental Pulp and Hard Tissues of the Tooth. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2020; 8: 605996.

277. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. American Journal of Physiology, 1996; 271: C1424-37.

278. Fujii J, Taniguchi N. Down regulation of superoxide dismutases and glutathione peroxidase by reactive oxygen and nitrogen species. Free Radical Research, 1999; 31: 301-8.

279. Arai K, Iizuka S, Tada Y, Oikawa K, Taniguchi N. Increase in the glucosylated form of erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutase in diabetes and close association of the

nonenzymatic glucosylation with the enzyme activity. Journal of Biological Chemistry, 1987; 924: 292-6.

280. Dreger H, Ludwig A, Weller A, Baumann G, Stangl V, Stangl K. Epigenetic suppression of iNOS expression in human endothelial cells: A potential role of Ezh2-mediated H3K27me3. Genomics, 2016; 107: 145-9.

281. Sommese L, Zullo A, Mancini FP, Fabbricini R, Soricelli A, Napoli C. Clinical relevance of epigenetics in the onset and management of type 2 diabetes mellitus. Epigenetics, 2017; 12: 401-15.

282. Buerki C, Rothgiesser KM, Valovka T, Owen HR, Rehrauer H, Fey M, Lane WS, Hottiger MO. Functional relevance of novel p300-mediated lysine 314 and 315 acetylation of RelA/p65. Nucleic Acids Res, 2008; 36: 1665-80.

283. Deng WG, Wu KK. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by p300 and p50 acetylation. Journal of Immunology, 2003; 171: 6581-8.

284. Guo Z, Zheng L, Liao X, Geller D. Up-Regulation of Human Inducible Nitric Oxide Synthase by p300 Transcriptional Complex. PloS One, 2016; 11: e0146640-e.

285. Chiu J, Khan ZA, Farhangkhoee H, Chakrabarti S. Curcumin prevents diabetes-associated abnormalities in the kidneys by inhibiting p300 and nuclear factor-kappaB. Nutrition, 2009; 25: 964-72.

286. Kaur H, Chen S, Xin X, Chiu J, Khan ZA, Chakrabarti S. Diabetes-Induced Extracellular Matrix Protein Expression Is Mediated by Transcription Coactivator p300. Diabetes, 2006; 55: 3104-11.

287. Li Y, Li X, He K, Li B, Liu K, Qi J, Wang H, Wang Y, Luo W. C-peptide prevents NF-κB from recruiting p300 and binding to the inos promoter in diabetic nephropathy. Federation of American Societies for Experimental Biology, 2018; 32: 2269-79.

288. Martins WK, Costa ET, Cruz MC, Stolf BS, Miotto R, Cordeiro RM, Baptista MS. Parallel damage in mitochondrial and lysosomal compartments promotes efficient cell death with autophagy: The case of the pentacyclic triterpenoids. Scientific Reports, 2015; 5: 12425.

289. Wang J, Wang X, He Y, Jia L, Yang CS, Reiter RJ, Zhang J. Antioxidant and Pro-Oxidant Activities of Melatonin in the Presence of Copper and Polyphenols In Vitro and In Vivo. Cells, 2019; 8: 903.

290. Munik M, Ekmekcioglu C. Prooxidant effects of melatonin: A brief review. Turkish Journal Of Biology, 2015; 39: 832-9.

291. Aksoy N, Vural H, Sabuncu T, Aksoy S. Effects of melatonin on oxidative-antioxidative status of tissues in streptozotocin-induced diabetic rats. Cell Biochemistry and Function, 2003; 21: 121-5.

292. Franco DG, Markus RP. The Cellular State Determines the Effect of Melatonin on the Survival of Mixed Cerebellar Cell Culture. PloS One, 2014; 9: e106332.

293. Li X, Chen X, Zhou W, Ji S, Li X, Li G, Liu G, Wang F, Hao A. Effect of melatonin on neuronal differentiation requires CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 lysine 14. Neuroscience, 2017; 364: 45-59.

294. Sharma R, McMillan CR, Tenn CC, Niles LP. Physiological neuroprotection by melatonin in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. Brain Research, 2006; 1068: 230-6.

295. Ugarte SD, Lin E, Klann E, Zigmond MJ, Perez RG. Effects of GDNF on 6-OHDA-induced death in a dopaminergic cell line: modulation by inhibitors of PI3 kinase and MEK. Journal of Neuroscience Research, 2003; 73: 105-12.

296. Chao CC, Lee EH. Neuroprotective mechanism of glial cell line-derived neurotrophic factor on dopamine neurons: role of antioxidation. Neuropharmacology, 1999; 38: 913-6.

297. Smith MP, Cass WA. GDNF reduces oxidative stress in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. Neuroscience Letters, 2007; 412: 259-63.

298. Turjanski AG, Leonik F, Estrin DA, Rosenstein RE, Doctorovich F. Scavenging of NO by Melatonin. Journal- American Chemical Society, 2000; 122: 10468-9.

299. Ozturk G, Coskun S, Erbas D, Hasanoglu E. The effect of melatonin on liver superoxide dismutase activity, serum nitrate and thyroid hormone levels. Japanese Journal of Physiology, 2000; 50: 149-53.

300. Inarrea P, Casanova A, Alava MA, Iturralde M, Cadenas E. Melatonin and steroid hormones activate intermembrane Cu,Zn-superoxide dismutase by means of mitochondrial cytochrome P450. Free Radical Biology and Medicine, 2011; 50: 1575-81.

301. Pourhanifeh MH, Hosseinzadeh A, Dehdashtian E, Hemati K, Mehrzadi S. Melatonin: new insights on its therapeutic properties in diabetic complications. Diabetology & Metabolic Syndrome, 2020; 12: 30.

БИОГРАФИЈА АУТОРА

Др Александра Милосављевић рођена је 3. септембра 1987. године у Крушевцу, Република Србија. Завршила је Шабачку гимназију, 2006. године, након чега је уписала Стоматолошки факултет Универзитета у Београду, школске 2006/2007. године. Дипломирала је 2012. године, са просечном оценом 9,20 и оценом 10,00 на дипломском испиту под називом: „Регенеративна терапија пародонтопатија“. Лекарски стаж обавила је у Дому здравља „Др Милутин Ивковић“ у Београду, у Клиничко-болничком центру Земун и на Стоматолошком факултету Универзитета у Београду, након чега је, 2014. године, положила стручни испит. Докторске студије на Стоматолошком факултету Универзитета у Београду уписала је школске 2013/2014. године и положила је све испите предвиђене наставним планом са просечном оценом 10,00. Октобра 2020. године бира се у звање истраживач сарадник и од школске 2020/2021. године ангажована је у извођењу практичне наставе на предмету Стоматолошка фармакологија на Стоматолошком факултету Универзитета у Београду. До сада је објавила два рада у часописима индексираним у цитатној бази *Science Citation Index*:

1. ***Milosavljević A**, Djukić L, Toljić B, Milašin J, Dželetović B, Brković B, Roganović J. Melatonin levels in human diabetic dental pulp tissue and its effects on dental pulp cells under hyperglycaemic conditions. Int Endod J.* 2018;51(10):1149-1158. (M21a)
2. *Radović N, Nikolić Jakoba N, Petrović N, **Milosavljević A**, Brković B, Roganović J. MicroRNA-146a and microRNA-155 as novel crevicular fluid biomarkers for periodontitis in nondiabetic and type 2 diabetic patients. J Clin Periodontol* 2018; 45(6):663-671. (M21a)

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Александра Милосављевић

Број индекса 4010/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„ЋЕЛИЈСКИ И МОЛЕКУЛАРНИ МЕХАНИЗМИ ДЕЈСТВА МЕЛАТОНИНА У ЗУБНОЈ ПУЛПИ И ПАРОТИДНОЈ ПЉУВАЧНОЈ ЖЛЕЗДИ КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ДИЈАБЕТЕС МЕЛИТУСОМ ТИП 2“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду,

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора- Александра Милосављевић

Број индекса- 4010/2013

Студијски програм- Докторске академске студије, модул: Базичне стоматолошке науке

Наслов рада- „ЋЕЛИЈСКИ И МОЛЕКУЛАРНИ МЕХАНИЗМИ ДЕЈСТВА МЕЛАТОНИНА У ЗУБНОЈ ПУЛПИ И ПАРОТИДНОЈ ПЉУВАЧНОЈ ЖЛЕЗДИ КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ДИЈАБЕТЕС МЕЛИТУСОМ ТИП 2“

Ментор- Проф. др Јелена Рогановић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду,

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„ЋЕЛИЈСКИ И МОЛЕКУЛАРНИ МЕХАНИЗМИ ДЕЈСТВА МЕЛАТОНИНА У ЗУБНОЈ ПУЛПИ И ПАРОТИДНОЈ ПЉУВАЧНОЈ ЖЛЕЗДИ КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ДИЈАБЕТЕС МЕЛИТУСОМ ТИП 2“

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду,

1. **Ауторство**. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално**. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прераде**. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима**. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прераде**. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима**. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.