

UNIVEZITET U BEOGRADU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Jugoslav M. Ilić

**ZNAČAJ VASKULARNOG ENDOTELNOG
FAKTORA RASTA I KOSTNOG
MORFOGENETSKOG PROTEINA-2 ZA
REPARATORNE SPOSOBNOSTI ZDRAVE I
DIJABETESOM IZMENJENE ZUBNE PULPE**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Jugoslav M. Ilić

**THE SIGNIFICANCE OF VASCULAR
ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND
BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2 IN
REPARATIVE ABILITIES OF HEALTHY
AND DIABETIC DENTAL PULP**

doctoral dissertation

Belgrade, 2012

MENTOR

Prof. dr Dragica Stojić,
redovni profesor Stomatološkog Fakulteta Univerziteta u Beogradu

KOMISIJA ZA OCENU I ODBRANU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

Prof. dr Mirjana Vujašković,
redovni profesor Stomatološkog Fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Georgina Pudar Branković,
redovni profesor Stomatološkog Fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Ljubomir Petrović
vanredni profesor Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Novom Sadu

DATUM ODBRANE

*Ovu doktorsku disertaciju posvećujem supruzi Aleksandri i ćerki Katarini,
za njihovo bezgranično razumevanje i podršku*

Prilikom izrade ove doktorske disertacije imao sam nesebičnu i stručnu pomoć i saradnju mnogih. Ovom prilikom želeo bih da se zahvalim:

- Prof. dr Dragici Stojić, mom mentoru, na inspirativnom intelektualnom vođenju kroz bazična i klinička istraživanja;
- Doc. dr Božidaru Brkoviću, rukovodiocu projekta 175021 Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije pod nazivom: „Kontrola bola i molekularni mehanizmi kao faktori regenerativne terapije u stomatologiji kod zdravih i pacijenata sa dijabetes melitusom“ (ova doktorska disertacija deo je pomenutog projekta);
- Članovima komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije: Prof. dr Mirjani Vujašković, Prof. dr Georgini Pudar Branković i Prof. dr Ljubomiru Petroviću na korisnim sugestijama
- Dr Jeleni Roganović, na ogromnoj pomoći u definisanju eksperimentalnog protokola za ELISA imunoesej i njegovom izvođenju
- Spomenki Lučić na nesebičnoj pomoći u laboratorijskim postupcima, a posebno u radu sa eksperimentalnim životinjama
- Prof. dr Jugoslav Vasiću sa Veterinarskog fakulteta na pomoći i savetima u okviru studije na životinjama
- Prof. dr Miroslavu Radenkoviću sa Medicinskog fakulteta na korišćenju laboratorije kojom rukovodi u nekim fazama istraživanja
- Prof. dr Ljiljani Tihaček Šojić na podsticaju i sugestijama
- Dr Katarini Radović i dr Ljiljani Đukić na pomoći u pojedinim eksperimentalnim koracima
- Dubravki Gavrilović sa Instituta za onkologiju Srbije na savetima u vezanim za statističku analizu
- Svim članovima kolektiva Klinike za bolesti zuba, koji su mi svojom svesrdnom podrškom pomogli u izvođenju doktorske disertacije
- Laboratoriji za biologiju maligne ćelije Instituta za onkologiju Srbije za obezbeđivanje tečnog azota
- Zaposlenima u Sekretarijatu fakulteta na tehničkoj podršci

ZNAČAJ VASKULARNOG ENDOTELNOG FAKTORA RASTA I KOSTNOG MORFOGENETSKOG PROTEINA-2 ZA REPARATORNE SPOSOBNOSTI ZDRAVE I DIJABETESOM IZMENJENE ZUBNE PULPE

SAŽETAK

Zubna pulpa je vezivno tkivo koje sa dentinom, koji je okružuje čini jedinstvenu embriološku i anatomsko-fiziološku celinu koja se uobičajno naziva pulpodentinski kompleks. Reakcije pulpe, uključujući i reparatorne procese, razlikuju se u osnovi od reakcije drugih vezivnih tkiva zbog njene specifične lokalizacije unutar čvrstih dentinskih zidova, kao i jedinstvenog vaskularnog sistema. Početak, vrsta i intenzitet reparatornog odgovora pulpe zavisi od niza ćelijskih procesa kao što su stimulacija sekrecije odontoblasta, specifična citodiferencijacija (odontoblasti, endotelijalne ćelije), kao i neovaskularizacija na mestu povrede. Signalni molekuli uključeni u transdukcione mehanizme ovih procesa su tkivni faktori rasta od kojih su od posebne važnosti koštani morfoGENETSKI protein 2 (BMP-2) i faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF). Povećana ekspresija BMP-2 je nađena u ćelijama pulpe tokom tercijerne dentinogeneze i utvrđena je uloga ovog faktora rasta na diferencijaciju specifičnih ćelija pulpe neophodnih u reparatornom odgovoru. Proces neovaskularizacije, regulisan aktivnošću VEGF, kritičan je za adekvatan pulpni reparatorni odgovor. Diabetes mellitus (DM) je rasprostranjeno oboljenje koje dovodi do brojnih metaboličkih poremećaja sa povećanjem oksidativnog stresa u tkivima. Značajne posledice ovog patofiziološkog

procesa su i promene u tkivnim koncentracijama raznih faktora rasta, posebno VEGF ali i BMP-2. Imajući u vidu značaj BMP-2 i VEGF u procesima reparacije dentina u zdravim zubima, kao i činjenicu da dijabetes u mnogim tkivima menja funkciju ovih faktora rasta, postavili smo hipotezu da dijabetes značajno menja nivo i ulogu BMP-2 i VEGF u reparatornim odgovorima pulpe.

Ciljevi ovog istraživanja bili su: 1. Odrediti koncentraciju BMP-2 i VEGF u zdravoj pulpi intaktnih zuba pacijenata sa DM tipa 2 i u kontrolnoj grupi zdravih ljudi; 2. Odrediti koncentraciju BMP-2 i VEGF u zdravoj pulpi zuba sa lečenim dubokim karijesom indirektnim prekrivanjem pulpe preparatom $\text{Ca}(\text{OH})_2$, kod pacijenata sa DM tipa 2 i u kontrolnoj grupi zdravih ljudi; 3. Na animalnom modelu pacova sa eksperimentalno izazvanim DM odrediti koncentraciju BMP-2 i VEGF u zdravoj zubnoj pulpi, kao i u kontrolnoj grupi životinja i ispitati u kojoj meri ovaj animalni model može da zameni ispitivanja dijabetičnih promena u zubnoj pulpi čoveka; i 4. Odrediti koncentraciju BMP-2 i VEGF u zubnoj pulpi koja je u fazi reparatornog odgovora eksperimentalno izazvanog primenom $\text{Ca}(\text{OH})_2$ kao sredstvom za direktno prekrivanje pulpe (DPP), kod pacova sa eksperimentalno izazvanim DM i kontrolnih životinja.

Studijom na ljudima je obuhvaćeno 28 zdravih osoba i 28 pacijenata obolelih od DM tip 2. Uzorci vitalne pulpe uzimani su iz intaktnih zuba, kao i zuba sa lečenim dubokim karijesom postupkom indirektnog prekrivanja pulpe, kod kojih je indikovana devitalizacija iz protetskih razloga. Studija na životinjama je sprovedena na 20 zdravih pacova i 20 pacova sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom jednom intraperitonealnom dozom (60 mg/kg) streptozotocina. Na distalnim površinama desnih inciziva životinja su preparisani kaviteti do tačkaste perforacije pulpe, nakon čega je urađeno direktno prekrivanje pulpe preparatom $\text{Ca}(\text{OH})_2$ i restauracija definitivnim ispunom. Levi incizivi istih životinja su korišćeni kao kontrola. Prvog i sedmog dana

nakon procedure prekrivanja, životinje su žrtvovane, incizivi su ekstrahovani i iz njih su uzeti uzorci pulpe. Tkivo pulpe je homogenizovano i lizirano u individualnim epruvetama za svaki uzorak. Koncentracije VEGF i BMP-2 u tkivnim lizatima su određene ELISA imunoesejima uz upotrebu odgovarajućih kompleta.

Koncentracija VEGF u pulpi intaktnih zuba ispitanika sa DM je $101,4 \pm 5,0$ pg/mg (srednja vrednost \pm standardna greška srednje vrednosti) što je za oko 49% više nego u u pulpi intaktnih zuba zdravih osoba. Kod ispitanika sa sa DM koncentracija BMP-2 u pulpi intaktnih zuba iznosi $436,3 \pm 28,0$ pg/mg i to je oko 5 puta više u odnosu na pulpi intaktnih zuba zdravih osoba. Kod zdravih osoba u pulpi zuba sa lečenim dubokim karijesom postupkom indirektnog prekrivanja, koncentracije VEGF i BMP-2, godinu dana nakon tretmana, iznosi $34,2 \pm 4,9$ pg/mg, odnosno $14,3 \pm 2,1$ pg/mg što je statistički značajno niže u odnosu na pulpu intaktnih zuba. Slično ovome, i kod ispitanika sa DM, koncentracije VEGF i BMP-2 u pulpi zuba sa lečenim dubokim karijesom postupkom indirektnog prekrivanja, određene godinu dana nakon tretmana su $67,8 \pm 8,2$ pg/mg odnosno $222,6 \pm 15,2$ pg/mg što je statistički značajno niže u odnosu na pulpu intaktnih zuba.

Koncentracija VEGF u pulpi intaktnih zuba životinja sa eksperimentalno izazvanim DM iznosi prosečno $18,9 \pm 0,8$ pg/mg što je statistički značajno više u odnosu na ove koncentracije kod zdravih životinja (prosečno $11,2 \pm 1,5$ pg/mg). Nasuprot tome, koncentracije BMP-2 u pulpi intaktnih zuba kod zdravih i kod životinja sa eksperimentalno izazvanim DM ne razlikuju se statistički značajno. Kod životinja sa eksperimentalno izazvanim DM koncentracija VEGF u pulpi zuba prvi dan nakon DPP iznosi $28,2 \pm 1,7$ pg/mg što je 46,1% više u poređenju sa intaktanim zubom i 29,4% više u odnosu na vrednost sedmog dana po DPP, i to su statistički značajne razlike. Slično, i kod zdravih eksperimentalnih životinja nivo VEGF u pulpi prvog dana nakon DPP

($18,9 \pm 1,0$ pg/mg) je 61,5% i 38% veći u odnosu na intaktan zub i zub sedam dana posle DPP, što je takođe statistički značajno. Koncentracije BMP 2 su kod eksperimentalnih životinja tek sedmog dana nakon DPP blago povišene u pulpi tretiranih u odnosu na pulpu intaktnih zuba, a ovo je statistički značajno izraženo u grupi sa indukovanim DM.

Zabeležene promene u koncentracijama VEGF i BMP-2 u pulpi tokom i nakon odbrambenih reakcija kod ljudi i na animalnom modelu ukazuju na značajnu ulogu ovih faktora rasta u reparatornim odgovorima pulpe.

KLJUČNE REČI: VEGF, BMP 2, reparatorni odgovor zubne pulpe, DM tip 2 kod ljudi i DM eksperimentalno izazvan kod pacova

NAUČNA OBLAST: Stomatološke nauke

UŽA NAUČNA OBLAST: Kliničke stomatološke nauke

UDK broj: 616.314.18: 616.379-008.64(043.3)

THE SIGNIFICANCE OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2 IN REPARATIVE ABILITIES OF HEALTHY AND DIABETIC DENTAL PULP

SUMMARY

Dental pulp is a connective tissue which makes embryologic, anatomic and functional entity with surrounding dentin referred to as the pulp-dentin complex. Due to specific localization within solid dentinal walls, as well as unique vasculature, pulp reactions significantly differ to reactions of other connective tissues. Commence, type and intensity of pulp reparative response depend on cellular events including up-regulation of synthetic and secretory activity of odontoblasts, specific cytodifferentiation, and neovascularization at the injury site. The signaling molecules involved in induction and regulation of these events are growth factors including very important bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF). BMP-2 expression was found to be increased during tertiary dentinogenesis, and significant role of this growth factor in differentiation of cells involved in pulp reparative response was established. Neovascularization, regulated by VEGF activity, was found to be critical for pulp reparative reaction. Diabetes mellitus (DM) is wide spread disease causing metabolic alterations as a result of increased oxidative stress in tissues. Significant consequence of this pathogenic mechanism is alteration in tissue levels of growth factors, particularly VEGF, but also BMP-2.

Considering the importance of BMP-2 and VEGF in processes of dentinal reparation, and the fact that DM alters the function of these growth factors in various tissues, the hypothesis of this study was that DM significantly alters the level and role of BMP-2 and VEGF in pulp reparative responses.

The aims of this study were to: 1. Determine the concentration of BMP-2 and VEGF in healthy pulp of intact teeth in patients with DM type 2 and in control group of healthy persons; 2. Determine the concentration of BMP-2 and VEGF in healthy pulp of teeth with conducted treatment of deep caries lesion using Ca(OH)_2 as indirect pulp capping agent, in patients with DM type 2 and in control group of healthy persons; 3. Determine the concentration of BMP-2 and VEGF in healthy pulp of intact teeth of rat as animal model in group with experimentally induced DM as well as in control group of healthy animals and to examine the possibility of this animal model to replace the investigations on diabetic alterations in human dental pulp; 4. Determine the concentration of BMP-2 and VEGF in dental pulp undergoing reparative response experimentally induced by Ca(OH)_2 as direct pulp capping agent, in rats with experimentally induced DM and in control group of healthy animals.

The human study was conducted on 28 healthy and 28 subjects with controlled DM type 2. The pulp specimens were obtained from experimental subjects' intact teeth and teeth with conducted treatment of deep caries lesion using Ca(OH)_2 as indirect pulp capping agent. Included teeth were with pulpectomy indication as a part of prosthetic rehabilitation plan. The animal study was conducted on 20 healthy rats and 20 rats with experimentally induced DM using single dose of streptozotocin (60 mg/kg, intraperitoneal). Deep cavities with pulp perforations were prepared on distal surfaces of right incisors in all animals, followed by direct pulp capping using Ca(OH)_2 based agent and definitive restoration. Left incisors were used as controls. First and seventh day

after capping procedure, animals were sacrificed, incisors were extracted and pulp specimens were obtained. Pulp tissue was homogenised in individual tubes using lysis buffer. VEGF and BMP-2 concentrations in tissue lysates were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

VEGF concentration in the pulp of intact teeth in human subjects with DM is 101.4 ± 5.0 pg/mg (mean \pm standard error of mean), and it is 49% higher with respect to pulp of intact teeth in healthy persons. BMP-2 concentration in the pulp of intact teeth in human subjects with DM is 436.3 ± 28.0 pg/mg and it is 5 fold higher compared to pulp of intact teeth in healthy subjects. Pulp tissue levels of VEGF and BMP-2 in teeth of healthy humans treated by indirect pulp capping, one year after treatment, are 34.2 ± 4.9 pg/mg and 14.3 ± 2.1 pg/mg, respectively, and they are statistically significantly lower with respect to pulp of intact teeth. Similarly, in human subjects with DM, pulp tissue levels of VEGF and BMP-2 in teeth treated by indirect pulp capping, one year after treatment, are 67.8 ± 8.2 pg/mg and 222.6 ± 15.2 pg/mg and they are also statistically significantly lower compared to pulp of intact teeth.

VEGF concentration in the pulp of intact teeth in animals with experimentally induced DM is 18.9 ± 0.8 pg/mg and it is statistically significantly higher in comparison to this concentration in healthy animals (11.2 ± 1.5 pg/mg). In contrary, BMP-2 concentrations in the pulp of intact teeth in healthy animals and animals with experimentally induced DM do not differ statistically significant. In animals with experimentally induced DM, VEGF pulp tissue concentration first day after direct pulp capping is 28.2 ± 1.7 pg/mg being 46.1% higher in comparison to intact teeth and 29.4% higher with respect to seventh day after direct pulp capping. The observed differences were statistically significant. Similarly, in healthy experimental animals, VEGF pulp tissue level first day after direct pulp capping (18.9 ± 1.0 pg/mg) is statistically

significantly higher in comparison to intact teeth and teeth seventh day after direct pulp capping (61.5% and 38%, respectively). BMP-2 pulp concentrations in experimental animals are mildly elevated seventh day after direct pulp capping, being significant in group with experimentally induced DM.

Observed alterations in VEGF and BMP-2 pulp tissue concentrations during and after reparatory reactions in humans and on animal model are suggestive of significant role of these growth factors in pulp reparative responses.

KEY WORDS: VEGF, BMP 2, reparative response of dental pulp, DM type 2 in humans, experimentally induced DM in rats.

SCIENTIFIC FIELD: Dental Sciences

SPECIFIC SCIENTIFIC FIELD: Clinical Dental Sciences

UDC: 616.314.18: 616.379-008.64(043.3)

SADRŽAJ

UVOD.....	1
FAKTORI RASTA KAO SIGNALNE MOLEKULE U PULPO-DENTINSKOM KOMPLEKSU.....	2
Pulpo-dentinski kompleks.....	2
Reaktivna i reparativna dentinogeneza.....	3
Kontrolni mehanizmi reaktivne i reparativne dentinogeneze.....	5
FAKTOR RASTA VASKULARNOG ENDOTELA.....	8
Molekularna struktura, kontrola ekspresije, funkcije i receptori.....	8
VEGF i pulpo-dentinski kompleks.....	10
KOŠTANI MORFOGENETSKI PROTEIN-2.....	12
Molekularna struktura, receptori i funkcije.....	12
BMP-2 i pulpo-dentinski kompleks.....	15
REGULACIJA VEGF i BMP-2 U DIJABETES MELITUSU.....	17
Dijabetes melitus.....	17
Patofiziologija dijabetičnih komplikacija.....	17
VEGF i BMP-2 u dijabetesu.....	20
DM i pulpa.....	21
RADNA HIPOTEZA.....	23
CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	25

MATERIJAL I METODE	27
STUDIJA NA LJUDIMA	28
Ispitanici i zubi uključeni u eksperiment.....	28
Uzimanje uzoraka.....	30
STUDIJA NA ŽIVOTINJAMA	31
Eksperimentalno izazvani DM.....	31
Operativna procedura i uzimanje uzoraka.....	32
IMUNOESEJ ZA KVANTIFIKACIJU VEGF I BMP-2	33
Priprema uzoraka.....	33
Eksperimentalni protokol za ELISA.....	34
STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	37
REZULTATI	38
STUDIJA NA LJUDIMA	39
Demografske karakteristike ispitanika.....	39
Koncentracije VEGF u pulpi.....	40
Koncentracije BMP-2 u pulpi.....	41
Korelacija koncentracija VEGF i BMP-2 u zubnoj pulpi.....	43
STUDIJA NA ŽIVOTINJAMA	44
Karakteristike eksperimentalno izazvanog DM.....	44
Koncentracije VEGF.....	46

Koncentracije BMP-2.....	48
Korelacije nivoa VEGF i BMP-2.....	50
KORELACIJA KONCENTRACIJA VEGF I BMP-2 U PULPI INTAKTNIH ZUBA LJUDI I EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA.....	50
DISKUSIJA.....	52
ZAKLJUČCI.....	61
LITERATURA.....	64

UVOD

FAKTORI RASTA KAO SIGNALNE MOLEKULE U PULPO-DENTINSKOM KOMPLEKSU

Pulpo-dentinski kompleks

Pulpa je vezivno tkivo ektomezenhimskeg porekla, smešteno u centralnom delu zuba. Ona je po svojoj osnovnoj građi (ćelije, međućelijska supstanca, vlakna, krvni sudovi i nervni završeci) slična drugim vezivnim tkivima u organizmu, ali ima i posebne karakteristike koje je čine jedinstvenom. Citološku strukturu pulpe karakterišu periferno raspoređeni odontoblasti, jedinstvene postmitotičke ćelije odgovorne za produkciju dentina, a čak i zrela pulpa ima karakteristike embrionalnih vezivnih tkiva zahvaljujući prisustvu mezenhimalnih stem ćelija i pulpnih progenitornih ćelija (1, 2). Pulpa je mikrocirkulatorni sistem u kome su arteriole i venule najkrupnijim vaskularni elementi i koji nema pravi kolateralni krvotok te je snabdevanje potpuno zavisno od malog broja krvnih sudova koji prolaze kroz apeksne otvore korena zuba (2, 3). Jedinstvena osobina pulpnog tkiva je da vazodilatacija nikada nije odbrambena reakcija jer vodi nekrozi usled specifične lokalizacije unutar čvrstih dentinskih zidova što ograničava povećanje kako tkivne zapremine tako i ukupne zapremine krvi (4). Ovo tkivo ima značajnu ulogu u funkcionisanju zuba time što obezbeđuje: a) nutritivno snabdevanje za pulpu i dentinski metabolizam, b) inervaciju i sa njom povezanu osetljivost, c) imunološki odgovor na bakterijsku infiltraciju i d) stvaranje dentina u fiziološkim uslovima i kao reakciju na razne vrste štetnih nadražaja kao što su karijes, operativne procedure, trauma, itd. (5).

Dentin je, za razliku od pulpe, čvrsto unutrašnje zubno tkivo koje se, prema Pashley-u, može smatrati poroznim, tubularnim biološkim kompozitom sačinjenim od

kristala hidroksiapatita utopljenih u kolageni matriks (6). Kanalikularna struktura dentina izraz je njegove anatomske povezanosti sa pulpom. Naime, produžeci odontoblasta pružaju se u dubinu od 0,1 do 1 mm u dentinske tubule (7). Dentin i pulpa su i funkcionalno neraskidivo povezani. Senzorna funkcija pulpe, između ostalog, ostvaruje se i stimulacijom intradentalnih nerava hidrodinamskim pokretima dentinskog likvora. Bakterijske supstance iz karijesnih lezija dolaze do pulpe kroz dentinske tubule i dovode najpre do imunog odgovora a zatim i do dentinogeneze kao odbrambene reakcije sa ciljem da se blokira njihov prodor do pulpe. Embriološka, anatomska i funkcionalna povezanost pulpe i dentina razlog je što se oni posmatraju kao jedinstven funkcionalni entitet koji se obično naziva pulpo-dentinski kompleks.

Reaktivna i reparativna dentinogeneza

Jedna od značajnih uloga pulpo-dentinskog kompleksa je i reakcija na štetne uticaje. Vrsta i intenzitet odgovora definisani su intenzitetom štetnog uticaja kao i stanjem samog pulpo-dentinskog kompleksa. Interakcije tkivnih signalnih procesa izazvanih povredom, odbrambenim i reparatornim reakcijama mogu biti raznovrsne pa definitivni odbrambeni odgovor može imati različite modalitete (8).

Povoljni odgovor pulpo-dentinskog kompleksa na povredu i oštećenje zubnog tkiva je deponovanje dentina sa ciljem da se spreči duže dejstvo štetnih stimulusa i nastanak ireverzibilnih oštećenja pulpe. Ovo se postiže fokalnom apozicijom tercijernog dentina neposredno u predeo delovanja štetnog uticaja (npr. karijesa, povrede, hemijskog ili fizičkog nadražaja). Ova vrsta dentina, nastala u patološkim uslovima, razlikuje se od primarnog (razvojnog) i sekundarnog (fiziološkog) dentina. Primarni i sekundarni dentin su morfološki skoro identični i pokazuju pravilnu tubularnu strukturu,

iako ima mišljenja da je broj tubula kod sekundarnog dentina redukovan (9). Značajne razlike u sastavu intertubularnog i peritubularnog dentinskog matriksa, govore u prilog autoradiografskim i ultrastrukturnim dokazima da odontoblasti vrše sekreciju na dva mesta- na nivou ćelijskog tela, gde stvaraju predentin i na nivou mineralizujućeg fronta gde povećavaju nivo peritubularnog dentina (10). Struktura tercijernog dentina, međutim, može biti različita sa čitavim spektrom mogućih morfologija počev od pravilnog tubularnog, koji se praktično ne razlikuje od primarnog ili sekundarnog, do distrofičnog i atubularnog sa inkorporiranim ćelijama. U tercijarnoj dentinogenezi, kao i u primarnoj i sekundarnoj, apozicija dentina podrazumeva kako frontalnu tako i peritubularnu sekreciju. Česte su i intertubularne kalcifikacije koje treba razlikovati od dentinogenetskih događaja jer nisu biološki, već fizičko-hemijski fenomen precipitacije hidroksiapatita (11). Oni mogu dodatno da doprinesu zaštiti pulpe od delovanja noksi.

Sekrecija tercijernog dentina je posledica kako delovanja blagih nadražaja, kao što su abrazija, atricija, hronični karijes, tako i intenzivnih, npr. akutni karijes ili ekstenzivne preparacije. Blagi stimulusi dovode do dodatne aktivacije postojećih odontoblasta u blizini dejstva nokse koji pojačavaju svoju sekretornu aktivnost povećavajući debljinu dentinskog sloja. Intenzivne nokse, međutim, uglavnom dovode do smrti odontoblasta koji se nalaze na pravcu njihovog dejstva. Ukoliko su uslovi u pulpo-dentinskom kompleksu povoljni, od stem/progenitorske ćelijske populacije diferenciraće se nova generacija odontoblastima sličnih ćelija koja preuzima ulogu sekrecije dentina od izgubljenih primarnih odontoblasta. Zbog suštinskih razlika u mehanizmima koji su osnova ova dva načina sekrecije tercijernog dentina uvedena je njegova podela na reaktivni, nastao sekrecijom primarnih odontoblasta, i reparativni koga stvaraju odontoblastima slične ćelije nakon smrti originalnih odontoblasta (12, 13).

Ova podela ima za cilj da naglasi različito poreklo dentina formiranog delovanjem noksi.

Iako se prisustvo tercijarnog dentina, nastalog kao reakcija na razne vrste i intenzitete nadražaja često može zapaziti u npr. radiološkim ili histološkim analizama zuba, vrlo je teško oceniti da li se radi o reaktivnom ili reparativnom dentinu. Imajući u vidu da se oni morfološki ne razlikuju, u nedostatku anamnestičkih podataka o posmatranom zubu, može se samo konstatovati prisustvo tercijarnog dentina nepoznatog porekla. Štaviše, zbog mogućeg delovanja raznih noksi, ili različitih intenziteta jedne, nastalo tkivo može biti kombinacija reaktivnog i reparativnog dentina.

Kontrolni mehanizmi reaktivne i reparativne dentinogeneze

Iako su reakcije pulpo-dentinskog kompleksa na nokse odavno opisane, ćelijski i molekularni mehanizmi njihove regulacije još uvek nisu potpuno objašnjeni. Signalni molekuli uključeni u transdukcione mehanizme ovih procesa su tkivni faktori rasta. Ovi molekuli pokazuju snažnu bioaktivnost u malim koncentracijama, često na nivou pikograma. Preciznu regulaciju ćelijskih aktivnosti u tkivima signalni molekuli ostvaruju aktivacijom specifičnih receptora na ćelijama u kojima se i stvaraju (autokrino dejstvo), ili aktivacijom receptora na susednim ćelijama (parakrino dejstvo). Receptori za faktore rasta pripadaju receptorima koji su odgovorni za ekspresiju specifičnih gena za sintezu proteina koji učestvuju u modulaciji ćelijske reakcije (14).

Reaktivna dentinogeneza nastaje kao rezultat interakcije postojećih odontoblasta i odgovarajućih molekularnih stimulusa koji dovode do podizanja nivoa njihove sekretorne aktivnosti (11). Odontoblasti pokazuju ekspresiju i sintezu brojnih faktora rasta u embrionalnom razvoju i tokom svog životnog ciklusa od kojih poseban značaj

imaju pripadnici familije faktora rasta transformacije β (transforming growth factor β : TGF- β) (15-18) koja osim više izoformi TGF- β obuhvata i koštane morfogenske proteine (BMP). Sintetisani i oslobođeni faktora rasta se ugrađuju u dentinski matriks (19) gde ostaju neaktivni do momenta njegovog rastvaranja ili demineralizacije kada njihovi efekti mogu da se ispolje. Danas postoje dokazi da mlečna kiselina, odgovorna za rastvaranje dentinskog tkiva tokom karijesa, kao i kalcijum hidroksid koji se upotrebljava za prekrivanje pulpe, mogu da oslobode tkivne faktore rasta iz dentinskog matriksa (20). Istraživanja pokazuju da izolovane komponente dentinskog matriksa kao i sami tkivni faktori rasta mogu da izazovu transdentinsku stimulaciju odontoblasta *in vivo* (11, 13, 21). Iako ima najviše podataka o prisustvu pripadnika TGF- β familije, dentinski matriks sadrži i druge faktore rasta među kojima se po značaju izdvajaju angiogeni (22), odgovorni za vaskularne reakcije tkiva koje su neophodne u procesima reaktivne dentinogeneze.

Reparativna dentinogeneza predstavlja složeniji proces, koji pre sekrecije dentina obuhvata čitavu kaskadu događaja: ćelijsku deobu progenitora, hemotaksu, ćelijsku migraciju i adheziju i na kraju citodiferencijaciju u odontoblastima slične ćelije (11, 18). Osnovni uslov za odvijanje reparativne dentinogeneze je postojanje progenitornih pulpnih ćelija. Nije poznato koje ćelijske linije mogu da se regrutuju za transformaciju, ali se veruje da su potencijalni kandidati Rouget-ovi periciti (perivaskularne ćelije), nediferencirane mezenhimalne ili mezoektodermalne ćelije i fibroblasti (1). Molekularna osnova diferenciranja ovih ćelija je sposobnost da vrše ekspresiju adekvatnih membranskih receptora za interakciju sa induktivnim molekulima odgovornim za proces nastanka odontoblastima sličnih ćelija (23). Molekule BMP i TGF- β izoforme su faktori rasta za koje ima najviše eksperimentalnih dokaza da indukuju diferencijaciju odontoblastima sličnih ćelija (24, 25). Interesantno je

napomenuti da je uočen njihov dozno zavisni efekat, što se povezuje sa različitim morfologijama reparativnog dentina koji može imati pravilnu tubularnu, ali i potpuno atipičnu strukturu. U visokim dozama ovi molekuli mogu da dovedu i do ćelijske smrti (20). Odsustvo dentinogenetskih događaja nakon ektopične implantacije izolovanih pulpnih tkiva dokaz je da se dentinogeneza može da odvija samo u pulpo-dentinskom okruženju (18). Ovo ukazuje da je interakcija pulpnih ćelija sa pulpnim ekstraćelijskim matriksom i u njemu prisutnim faktorima rasta i induktivnim molekulima neophodna u reparativnim procesima pulpe.

Novija istraživanja ukazuju da su inflamatorni procesi preduslov za regeneraciju (26). U vezi sa ovime je interesantno napomenuti da iako proinflamatorni medijatori dovode do oštećenja pulpnih tkiva, skorije *in vivo* studije su pokazale da citokini, kao tumorski faktor nekroze α (tumor necrosis factor α : TNF- α), mogu da pod određenim uslovima indukuju diferencijaciju stem ćelija pulpe u odontoblastima slične ćelije (27). Izgleda da pulpo-dentinski kompleks dozno zavisno reaguje na medijatore inflamacije: male doze, odnosno blaga inflamacija, deluju povoljno i pospešuju reparativne procese, dok velike doze i jak inflamatorni odgovor dovode do tkivnog oštećenja i mogućeg odsustva reparativnog odgovora (28).

Angiogeneza, proces nastanka novih krvnih sudova iz mreže postojećih, od fundamentalnog je značaja ne samo za razvoj tkiva već i za njegov odgovor na povredu (29). Prisustvo adekvatne vaskularne mreže na mestu povrede od kritičnog je značaja i u procesima reparativnog odgovora pulpe (30). Iako pulpa ima bogatu mrežu krvnih sudova, u toku povrede ona se procesima angiogeneze i dalje povećava da bi se za reparativne procese obezbedilo efikasno snabdevanje nutrientima (31). Ključna uloga u regulaciji ovih procesa pripada angiogenim faktorima rasta, među kojima se kao najdominantniji izdvaja faktor rasta vaskularnog endotela (vascular endothelial growth

factor: VEGF). Čelije humane pulpe spontano proizvode VEGF (32), a prisustvo ovog signalnog molekula potvrđeno je i u dentinskom matriksu (22). Ovi nalazi ukazuju na potencijal ovih faktora rasta da učestvuju u regulaciji pulpne reparacije.

FAKTOR RASTA VASKULARNOG ENDOTELA

Molekularna struktura, kontrola ekspresije, funkcije i receptori

Do otkrića i identifikacije VEGF molekula su došle dve odvojene grupe istraživača. Senger i sar. (33) su 1983. opisali delimičnu purifikaciju proteina iz medijuma tumorskih ćelija zamorca, sposobnog da indukuje vaskularnu propustljivost i nazvali ga „tumorski faktor vaskularne permeabilnosti“ (VPF). Ferrara i Henzel (34) su 1989. izolovali iz medijuma pituitarnih folikularnih ćelija govečeta specifični mitogen endotelnih ćelija koga su nazvali „faktor rasta vaskularnog endotela“. Kloniranje DNK sekvenci za VPF i VEGF je pokazalo da su u pitanju isti molekuli.

VEGF (koji se označava i kao VEGF-A) pripada genskoj porodici angiogenih faktora rasta zajedno sa faktorom rasta placente (PIGF), VEGF-B, VEGF-C i VEGF-D. Molekul VEGF je antiparalelni homodimerni protein- čine ga dva ista polipeptida kovalentno povezana sa dve disulfidne veze (35). Humani gen za VEGF ima osam eksona, odvojenih sa sedam introna, i lokalizovan je na hromozomu 6p21.3. (36). Različitim povezivanjem eksona se, u procesu sinteze proteina, dobijaju četiri izomerna oblika VEGF koji mogu imati 121, 165, 189 i 206 aminokiselina (obeležni kao VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆). Izomerni oblik VEGF₁₂₁ je kiseli, rastvorljivi

polipeptid (što mu daje sposobnost da odmah ispolji efekte), dok su forme VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆ bazne i deponuju se u međucelijski matriks odakle mogu da se oslobode u rastvorljive, aktivne oblike vezivanjem za heparin. Dominantni i najzastupljeniji oblik, VEGF₁₆₅, može da se nađe bilo kao rastvorljiv ili kao vezan za ćelijsku membranu ili međucelijski matriks (35).

Postoji više mehanizama koji regulišu ekspresiju gena za VEGF. Nizak parcijalni pritisak kiseonika (hipoksija) u tkivu koji nastaje u brojnim patofiziološkim okolnostima, je glavni induktor sinteze informacione RNK za VEGF. Danas se zna da je protein poznat pod imenom hipoksijaom izazvani faktor 1 (HIF-1) osnovni medijator hipoksičnih odgovora tkiva, pa i VEGF ekspresije (37). Nekoliko ključnih faktora rasta, među kojima su faktor rasta epiderma, TGF- α , TGF- β , faktor rasta keratinocita, faktor rasta fibroblasta, faktor rasta trombocita, podižu nivo ekspresije gena za VEGF. Hormoni, kao tireostimulirajući, adrenokortikotropni i gonadotropini, moćni su induktori VEGF ekspresije (35).

Jedna od osnovnih funkcija VEGF je stimulacija rasta i deobe endotelnih ćelija što vodi indukciji angiogeneze u brojnim fiziološkim (npr. embrionalni razvoj, skeletni rast) i patološkim stanjima (npr. mikro- i makrovaskularne komplikacije dijabetes melitusa) (38). VEGF je i faktor preživljavanja endotelnih ćelija jer sprečava apoptozu koju može da izazove deficit seruma (39). Iako su endotelne ćelije primarne „mete“ za VEGF, njegovi mitogeni efekti se mogu zapaziti i na drugim tipovima ćelija (epitelne, pulpni fibroblasti...) (40, 41). Povećanje vaskularne permeabilnosti je funkcija koja ukazuje na značajnu ulogu ovog molekula u inflamaciji i drugim patološkim stanjima (35). VEGF indukuje dozno zavisnu vazodilataciju i sledstvenu hipotenziju što ukazuje na njegovu ulogu u regulaciji krvnog pritiska (42). Značajni su i hematopoezni efekti

koji obuhvataju indukciju granulocitno-makrofagnih progenitora, B i mijeloidnih ćelija, a sa druge strane supresiju razvoja dendritičnih ćelija (35).

Signalne puteve preko kojih se ispoljavaju opisani efekti regulišu transmembranski VEGF receptori, VEGF-R1 (Flt-1) i VEGF-R2 (KDR) kao i rastvorljivi receptor sFlt-1. Svi oni pripadaju grupi tirozin kinaza receptora (38). Osim njih molekul VEGF se vezuje i za grupu koreceptora poznatih pod imenom neuropilini (NP). Opšte je prihvaćeno stanovište da je VEGF-R2 glavni medijator mitogenih, angiogenih, hemotaktičkih efekata kao i povećanja vaskularne permeabilnosti (35). Ovaj molekul pokazuje snažnu ligand-zavisnu fosforilaciju tirozin kinaze što je znak da se njegovi efekti snažno ispoljavaju tek nakon vezivanja VEGF kao njemu specifičnog liganda. Nasuprot ovome, VEGF-R1 se smatra negativnim regulatorom VEGF aktivnosti (43). On ispoljava slabu fosforilaciju tirozin kinaze kao odgovor na VEGF vezivanje, što ukazuje da on ne započinje specifične ćelijske procese već, verovatno, ima ulogu kompeticije sa VEGF-R2. Vezujući VEGF za sebe on smanjuje dostupnost ovog signalnog molekula receptoru VEGF-R2. Istu funkciju ima i rastvorljivi receptor sFlt-1, ali kompetitivno vezivanje VEGF on ispoljava u međućelijskom matriksu tkiva, npr. kornee što sprečava njenu vaskularizaciju (38). Koreceptori NP vrše funkciju prezentovanja VEGF receptorima VEGF-R2 čime se značajno potencira efikasnost njegovih transdukcionih signala (35).

VEGF i pulpo-dentinski kompleks

Iako je pulpa dobro vaskularizovano tkivo, neke specifične situacije zahtevaju dodatno povećanje gustine vaskularne mreže. Dok lokalno razgranavanje vaskularne mreže ima nezamenjivu ulogu u podržavanju reparatornih aktivnosti pulpe (30),

generalizacija ovog procesa na celu pulpu može da vodi ireverzibilnim oštećenjima imajući u vidu lokalizaciju pulpe unutar čvrstih dentinskih zidova (44). Uzimajući u obzir funkciju VEGF i potrebu pulpe da u pojedinim fiziološkim ili patološkim situacijama modifikuje vaskularnu mrežu, više istraživača je utvrdilo da ćelije pulpe pokazuju spontanu ekspresiju VEGF, kao i receptora VEGF-1 i VEGF-2 (32, 41, 45). Istraživanja Matsushita i sar. pokazuju da, delujući autokrino, VEGF može da indukuje hemotaksu, proliferaciju i/ili diferencijaciju pulpnih ćelija (41). Ekspresija VEGF u pulpi pokazana je i u imunohistohemijskim istraživanjima Artese i sar. i Güven i sar. (46, 47).

Ekspresija VEGF i VEGFR-2 utvrđena je u odontoblastima i unutrašnjem gleđnom epitelu zuba u razvoju, sugerišući ulogu ovih molekula u razvoju odontoblasta i diferencijaciji ćelija unutrašnjeg gleđnog epitela u ameloblaste (48, 49). Kod ljudi je ekspresija VEGF u odontoblastima i pulpnim fibroblastima izraženija kod zuba sa nezavršenim u odnosu na zube sa završenim rastom, što ukazuje na ulogu VEGF u maturaciji zuba (50). Na postojanje ove uloge ukazuju i nalazi Fletcher-a i sar. koji su pokazali da primena VEGFR inhibitora izaziva dozno zavisno oštećenje inciziva kod pacova, koje se manifestuje degeneracijom i nekrozom odontoblasta i sledstvenim smanjenjem produkcije dentina, kao i degeneracijom gleđnog organa što dovodi do tanjih, diskolorisanih i lomljivih inciziva (51).

Promene u parametrima aktivnosti VEGF praćene su i u nekim patološkim stanjima pulpe. U uslovima hipoksije zabeležena je kod fibroblasta pulpe tri, a kod stem ćelija pulpe osam puta veća ekspresija VEGF u odnosu na uslove normoksije što sugeriše da ovaj signalni molekul učestvuje u revaskularizaciji hipoksične pulpe (52). Tran-Hung i sar. su utvrdili povećanu sekreciju VEGF u kulturi humanih pulpnih ćelija kao posledicu povrede, ali i aplikacije HEMA adhezivne smole (53). Povećanu

ekspresiju VEGF u ćelijama pulpe pod dejstvom HEMA pokazali su i Mantellini i sar. (54). Proinflamatorni citokini mogu da indukuju povećanu ekspresiju gena za VEGF u humanoj pulpi što utiče na destrukciju pulpnog tkiva zbog ekspanzije vaskularne mreže kao posledice progresije inflamacije (55). Na značajnu ulogu VEGF u procesima zapaljenja pulpe ukazuju i radovi u kojima je pokazana koekspresija VEGF i ciklooksigenaze 2 (COX-2), enzima odgovornog za sintezu inflamatornih prostanoida (47). Lipopolisaharidi, produkti gram-negativnih bakterija i lipoteihoična kiselina, produkt gram pozitivnih bakterija, ali i same bakterije mogu da indukuju povećanu ekspresiju VEGF u makrofagima, stem ćelijama pulpe, ćelijama sličnim odontoblastima (32, 56-60). Aplikacija rekombinantnog VEGF indukuje angiogenezu u isečcima humanih zuba implantiranim u imunodeficijentne miševе, dok ekstrakt dentinskog matriksa, za koga se zna da sadrži VEGF, pokazuje proangiogenu aktivnost (31, 61).

KOŠTANI MORFOGENETSKI PROTEIN-2

Molekularna struktura, receptori i funkcije

Aktivnost BMP je prvi put zapažena u pionirskim radovima Urista koji je opisao autoindukciju kosti pod dejstvom koštanog matriksa (62). Proteini odgovorni za ove funkcije su otkriveni kasnih osamdesetih godina 20. veka, a kloniranje BMP-2 su opisali Wozney i sar. 1988 (63). BMP-2 pripada genskoj familiji BMP faktora rasta koji su deo TGF- β familije i sa kojima pokazuje homologiju u sekvenci aminokiselina. BMP-2 je homodimerni protein čiji se gen kod čoveka nalazi na hromozomu 20p12

(64). Sintetiše se kao prekursori proprotein od koga se aktivnošću serin endoproteaza dobija maturirani, aktivni faktor rasta. Zreli molekul se, uglavnom, sastoji od dva identična polipeptida- monomera koji su međusobno povezani jednom disulfidnom vezom. Svaki molekul monomera stabilisan je sa tri disulfidne veze koje formiraju strukturu poznatu kao „cisteinski čvor“-zajednički biohemijski motiv koji postoji u svim signalnim molekulima TGF- β familije (65). Zreli BMP-2 molekul ima 396 aminokiselina. Ovaj molekul karakteriše sposobnost heterodimerizacije sa drugim članovima BMP grupe faktora rasta. Heterodimeri BMP2/5, BMP2/6, BMP2/7, identifikovani kako *in vivo* tako i *in vitro*, pokazuju snažnije efekte od odgovarajućih homodimera (66).

BMP-2 ostvaruje svoje efekte posredstvom šest BMP receptora od kojih se tri ubrajaju u tip I (ActRIa ili Alk2, BRIa ili Alk3 i BRIb ili Alk6), a tri u tip II (BRII, ActRIIA i ActRIIB) (67). Ovo su transmembranski serin/treonin kinaza receptori koji međusobno stvaraju heteromerne receptorne komplekse. BMP-2 pokazuje visok afinitet za receptore tipa I, a nizak za receptore tipa II. Međutim usaglašena akcija oba tipa receptora je neophodna za aktivaciju specifičnih signalnih puteva. BMP-2 može na dva načina da stvori kompleks sa receptorima i time pokrene signalne puteve. Prvi način je vezivanje za preformirani kompleks receptora tipa I i tipa II, čime započinje Smad intraćelijska kaskadna reakcija (66). U ovoj reakciji se aktiviraju signalni proteini Smad1, Smad5 i Smad8, koji se nakon fosforilacije i udruživanja sa Smad4, prebacuju u ćelijsko jedro gde aktiviraju odgovarajuću gensku ekspresiju. Ovo je osnovni, ili kako se još naziva, kanonski signalni put za BMP-2. Drugi način aktivacije receptora je vezivanjem molekula BMP-2 za receptore tipa I, za koje on pokazuje visok afinitet, nakon čega se za ovaj kompleks vezuje receptor tipa II. Ovo je način kojim se aktiviraju drugi, nekanonski, signalni putevi koji ne pripadaju Smad-u kao što su MAPK, PI3 i

PKC (66). BMP receptori su homologni i svi učestvuju aktivaciji kako Smad tako i puteva koji ne pripadaju Smad-u, ali nijedan nije suvišan jer je svaki odgovoran za posebne ćelijske procese: npr. BR1b vodi diferencijaciju mezenhimalnih ćelija u odontoblaste, dok BR1a vodi mezenhimalne ćelije u adipogenu diferencijaciju (68).

Svi elementi u BMP-2 signalnoj transdukciji su precizno regulisani interakcijama sa nizom različitih kontrolnih proteinskih molekula. Antagonisti, od kojih je najpoznatiji nogin, vezuju se za BMP-2 molekul i inaktiviraju ga. Ekspresiju nogina reguliše BMP-2 u negativnoj povratnoj sprezi, što je potvrda postojanja precizne regulacije interakcija ova dva antagonistička molekula. Kompetitivni receptori vrše negativnu kontrolu BMP-2 signalnog puta ulazeći u kompeticiju sa BMP receptorima za vezivanje sa ligandom. Tako BMP i aktivin membranski vezani protein (BAMBI) ulazi u kompeticiju sa receptorima tipa I. Koreceptori (npr. molekuli repulzivnog vođenja-RGM) potenciraju BMP-2 signalni put na nivou prezentovanja BMP-2 receptorima, a intracelularni regulatorni proteini (npr. BMP receptor vezani molekul 1-BRAM 1) učestvuju u finoj regulaciji Smad i non Smad intraćelijskih signalnih puteva (66).

BMP-2 je važni signalni molekul kako u embrionalnom tako i postnatalnom razvoju i održavanju normalnog funkcionisanja odraslog organizma, a posebno skeleta. Njegova uloga u enhondralnom i osteogenom razvoju kao i u regeneraciji kosti jasno je utvrđena. On ima važnu ulogu i u neosteogenim razvojnim procesima (69). Na ćelijskom nivou BMP-2 reguliše migraciju, citoskeletno preuređenje i apoptozu (66, 70). BMP-2 usmerava embrionalni razvoj ćelija neuralnog grebena u pravcu neuronskog fenotipa. Pod njegovim delovanjem dolazi do inhibicije ekspanzije začetaka ekstremiteta i do indukcije hondrocičnih i osteoblastičkih prekursora. Uloga BMP-2 u embrionalnom razvoju posebno je rasvetljena eksperimentima na embrionima životinjama kod kojih su blokirani geni odgovorni za njegovu ekspresiju. Embrioni

miševa deficijenti za BMP-2 ne mogu da završe embrionalni razvoj, i umiru između 7,5 i 10,5 embrionalnog dana sa defektima u razvoju srca, skeleta, očiju (66, 69). BMP-2 je moćan morfogen kosti. Osteoinduktivni kapacitet ovog signalnog molekula je pokazan na eksperimentalnim životinjama i u kliničkim studijama (71, 72). Povećanje ekspresije BMP-2 zapaženo u ćelijama koje iniciraju nastanak kalusa u regeneraciji koštanih fraktura doprinelo je razvoju raznih formulacija BMP-2 koje danas služe kao sredstvo u humanoj regenerativnoj terapiji (66). Poznato je da BMP-2 indukuje ektopično formiranje kosti, lokalnu mineralizaciju i inflamaciju u raznim tkivima (73). Zabeleženo je učestvovanje BMP-2 i u angiogenetskim procesima u smislu pro-proliferativnih i promigratornih uticaja na endotelne ćelije (74). Oksidativni stres, inflamacija ili hiperglikemija mogu da izazovu ekspresiju BMP-2 u glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova što ukazuje na moguću ulogu u patogenezi vaskularnih kalcifikacija (70). Hiperaktivnost BMP-2 signalnog puta je u osnovi progresivne osificirajuće fibrodisplazije, a njegova hipoaktivnost je patofiziološka osnova idiopatske pulmonalne arterijske hipertenzije (66).

BMP-2 i pulpo-dentinski kompleks

BMP signal je fundamentalni regulator razvoja zuba. Ekspresija BMP-2, BMP-4 i BMP-7 u dentalnom epitelu tokom započinjanja zubnog razvoja u vezi je sa epitelno-mezenhimalnim interakcijama koje dovode do indukcije zubnog razvoja (75). Ekspresija BMP-2 se takođe pojačava u kasnijoj fazi razvoja zuba tokom diferencijacije odontoblasta (76, 77).

Ekspresija gena za BMP-2, kao i BMP-4, -6, -7 i sve njihove receptore utvrđena je u humanim pulpnim ćelijama (78-80). BMP-2 pozitivne ćelije se, prema nalazima

Kaida i sar. grupišu u sloju pulpe neposredno ispod reparatnog dentina i oko kapilarne mreže kao odgovor na terapijski postupak direktnog prekrivanja (81). Štaviše, Nakashima i sar. su simulirajući procese pulpne reparacije u kulturi tkiva pulpnih ćelija, uočili povezanost uvećane ekspresije BMP-2 i diferencijacije ćelija u preodontoblaste (25). Aktivnost BMP-2 u ovakvim slučajevima praćena je dvostruko uvećanom aktivnošću alkalne fosfataze, markera biomineralizacije tkiva (82). BMP-2 aplikovan na amputiranu pulpu *in vivo* indukuje stvaranje velike kolićine reparatnog dentina (83). Stimulacija humanih stem ćelija mlećnih zuba da se diferenciraju u odontoblaste pod dejstvom dentinskog derivata BMP-2, i stimulacija odontoblasta komponentama dentinskog matriksa da stvaraju reakcionarni dentin, indirektni su dokazi postojanja BMP faktora rasta u dentinskom matriksu (13, 84). *In vivo* i *in vitro* nalazi Iohara i sar. i Yang i sar. pokazuju da humani rekombinantni BMP-2 usmerava diferencijaciju pulpnih stem/progenitor ćelija u odontoblaste sa sledstvenom sekrecijom dentina (85, 86). Najnovija istraživanja pokazuju da su elementi kanonskog Smad i nekanonskog MAPK signalnog puta uključeni u BMP-2 indukovanu odontoblastnu diferencijaciju humanih pulpnih ćelija (87, 88). Ima nalaza koji ukazuju da BMP-2 kontroliše ekspresiju VEGF u odontoblastima i zato je neophodan za pulpnu vaskulogenezu, posebno u subodontoblastnom regionu pulpe (89). Svi ovi nalazi ukazuju na znaćajnu ulogu BMP-2 u procesu stimulacije odontoblasta i sledstvene sekrecije tercijernog dentina kao pulpnog odgovora na povrede razlićitog intenziteta.

REGULACIJA VEGF i BMP-2 U DIJABETES MELITUSU

Dijabetes melitus

Dijabetes melitus (DM) je bolest koja dovodi do metaboličkih poremećaja sa hiperglikemijom kao osnovnom karakteristikom. Nakon kardiovaskularnih i malignih bolesti, DM je na trećem mestu kao uzrok smrti u SAD (90). Prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ oko 600 000 ljudi u Srbiji (8,2% populacije) boluje od ovog oboljenja (91). Etiološki se razlikuju dva tipa ove bolesti: DM tip 1 gde je uzrok hiperglikemije destrukcija β ćelija endokrinog dela pankreasa koja vodi u deficit insulina, i DM tip 2 sa hiperglikemijom kao posledicom kombinacije metaboličkih disbalansa (rezistencija na insulinsku aktivnost, relativni insulinski deficit, visoka hepatična produkcija glukoze, neadekvatni kompenzatorni insulinski sekretorni odgovor). Dok DM tip 1 uglavnom nastaje kao autoimuno ili idiopatsko oboljenje, patogeneza DM tip 2 je kompleksna, a faktori rizika za pojavu su starost, neadekvatna ishrana, nedostatak fizičke aktivnosti i sl. DM tip 2 čini 90 do 95% svih dijagnostifikovanih slučajeva ove bolesti (92).

Patofiziologija dijabetičnih komplikacija

Obe forme DM karakteriše razvoj mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija. Dijabetes specifična mikrovaskularna oboljenja, od kojih su najpoznatije bolesti retine, bubrežnih glomerula i vasa nervorum imaju sličnu patofiziologiju. U ranim fazama DM intracelularna hiperglikemija izaziva povećanje vaskularne permeabilnosti i abnormalnosti u protoku periferne krvi. Ove promene su odraz

zmanjene aktivnosti vazodilatatora kao npr. azot monoksida (NO), povećane aktivnosti vazokonstriktora kao angiotenzina II i endotelina-1, i oslobađanja faktora koji pospešuju vaskularnu permeabilnost kao npr. VEGF. Kvantitativne i kvalitativne promene strukture ekstracelularnog matriksa vode u ireverzibilno povećanje vaskularne permeabilnosti. Kasnije se javlja gubitak mikrovaskularnih ćelija, delom i kao posledica programirane ćelijske apoptoze. Zbog hiperprodukcije ekstracelularnog matriksa indukovane povećanom ekspresijom faktora rasta iz TGF- β familije i depozicije plazma proteina, nastale usled ekstravazacije, dolazi do progresije kapilarne okluzije sa smanjenjem protoka krvi i poremećajem difuzije kiseonika i nutrienata kroz bazalnu membranu. Hiperglikemija može da smanji produkciju trofičnih faktora endotelnih ćelija i neurona. Ove tkivne promene, zajedno dovode do edema, ishemije i hipoksije što u retini izaziva neovaskularizaciju, u bubrezima glomeruloskleroza i proteinuriju, a u perifernim nervima multifokalnu aksonsku degeneraciju (93). Lokalno u tkivima, hiperglikemija remeti procese adherencije, hemotakse i fagocitoze kod polimorfonukleara i dovodi do hiperprodukcije proinflamatornih citokina što modifikuje zapaljensku reakciju (90).

Dijabetične makrovaskularne promene, obuhvataju ubrzanu ateroskleroza velikih krvnih sudova koja započinje endotelnom disfunkcijom. U dijabetičnim arterijama, endotelna disfunkcija nastaje kako zbog hiperglikemije tako i insulinske rezistencije specifične za fosfatidilinozitol-3-OH kinaza ciklus (94). Ova ciklus-zavisna insulinska rezistencija dovodi do smanjene produkcije anti-aterogenog molekula NO, ubrzane proliferacije glatkih mišićnih ćelija vaskularnog zida i produkcije plazminogen aktivator inhibitor-1 (PAI-1). Hiperglikemija, odvojeno, takođe inhibira stvaranje NO u endotelnim ćelijama, a stimuliše i nastanak PAI-1 (95). Hiperglikemija i insulinska rezistencija imaju ulogu i u patogenezi dijabetične dislipidemije, sa povećanim nivoima

aterogenog holesterola. Sve ove promene značajno povećavaju rizik za nastanak koronarnog srčanog oboljenja i ishemijske bolesti mozga.

Patofiziološki mehanizmi kojima hiperglikemija izaziva ove različite mikrovaskularne i makrovaskularne promene su: A-povećano metabolisanje glukoze u poliolnom putu, B-povećano stvaranje glikozilisanih produkata (AGE), C-aktivacija protein kinaze C (PKC) i D-povećano metabolisanje glukoze u heksozaminskom putu (93).

A. Poliolni put je proces kroz koji se u fiziološkim uslovima metaboliše mali deo glukoze. U hiperglikemiji protok kroz ovaj ciklus se povećava, što u ćeliji dovodi do povećanja koncentracije sorbitola, međuprodukta ovog ciklusa. On može da dovede do osmotskog oštećenja mikrovaskularnih ćelija obzirom da teško prolazi kroz ćelijsku membranu. Metabolisanje sorbitola dovodi i do potenciranja drugih štetnih mehanizama- nastanka AGE i aktivacije PKC.

B. AGE nastaju vezivanjem međuprodukata metabolizma glukoze (npr.glioksala) za amino grupe intracelularnih i ekstracelularnih proteina. Ovakvi proteini imaju modifikovanu funkciju, abnormalno reaguju sa drugim proteinima iz ekstraćelijskog matriksa ili ćelije i mogu da se vezuju za AGE receptore aktivirajući brojne ćelijske procese. Smatra se da se ovakvom aktivacijom AGE receptora stimuliše ekspresija proinflamatornih citokina i faktora rasta uključujući BMP-2 kao dela TGF- β familije i VEGF (38, 96). Oni potenciraju odgovarajuće, dijabetu karakteristične, patološke promene- hroničnu inflamaciju, ektopičnu kalcifikaciju zida krvnih sudova, neoangiogenezu i povećanje vaskularne permeabilnosti. AGE deluju i na kolagen međućelijskog matriksa i bazalne membrane endotela, smanjujući im elastičnost, a povećavajući propustljivost. U endotelnim ćelijama AGE nastaju već u prvoj nedelji hiperglikemije.

C. Hiperglikemijska aktivacija PKC, nastala od *de novo* sintetisanog diacilglicerola (DAG), dovodi do brojnih patoloških posledica uključujući inhibiciju ekspresije endotelne NO sintetaze, indukciju ekspresije VEGF, članova TGF- β familije, endotelina-1, pospešivanja nastanka slobodnih radikala.

D. Razgradnja glukoze u hiperglikemiji može da se poveća i kroz heksozaminski put, koji nije uobičajni način njenog metabolisanja. Produkt ovog ciklusa je N-acetilheksozamin koji u složenim biohemijskim reakcijama dovodi do promena u genskoj ekspresiji (npr. gena za TGF- β) i proteinskoj funkciji doprinoseći patogenezi dijabetičnih komplikacija.

Svi ovi raznorodni mehanizmi nastaju kao posledica jednog hiperglikemijom indukovano procesa: hiperprodukcije superoksida u mitohondrijalnom elektronskom transportu. Naime, povećan metabolizam glukoze dovodi do povećanog stvaranja elektron donora (NADH i FADH) u ciklusu trikarbonskih kiselina što generiše povećanje potencijala mitohondrijalne membrane pumpanjem protona kroz nju. Ovo inhibiše elektronski transport produžavajući poluživot slobodnih radikala. Na ovaj način se u tkivu povećava oksidativni stres koji leži u osnovi svih dijabetičnih patofizioloških promena i čije je u postojanje u DM jasno utvrđeno (93).

VEGF i BMP-2 u dijabetesu

Činjenica da je VEGF ključni regulator vaskulogeneze i angiogeneze, a da su dijabetične komplikacije u suštini mikrovaskularni ili makrovaskularni poremećaji, ukazuje na značajnu ulogu ovog faktora rasta u njihovoj patofiziologiji (38). Nivoi VEGF proteina, VEGF receptora i ekspresije informacione RNK za VEGF u mikrovaskularnoj i makrovaskularnoj mreži obolelih od DM su poremećeni. U nekim

organskim sistemima povećan nivo VEGF je stimulus patološke angiogeneze (npr. okularna neovaskularizacija u dijabetičnoj retinopatiji), dok u drugim tkivima sniženi VEGF nivo dovodi do otežanog zarastanja rana i/ili periferne neuropatije. Porast VEGF povezan je sa tkivnom hipoksijom i sledstvenim povećanjem ekspresije gena za VEGF, dok se snižen nivo VEGF vezuje za hroničnu tkivnu inflamaciju koja redukuje broj ćelija i modifikuje njihove odgovore (97).

Indukcija BMP-2 je u DM pokazana u krvnim sudovima i povezuje se sa povećanim oksidativnim stresom, inflamacijom i hiperglikemijom (70). Oksidativni stres, koji je osnovna karakteristika tkiva u DM, stimuliše ekspresiju BMP-2 u krvnim sudovima, dok BMP-2 može da indukuje ekspresiju COX-2 potencirajući tkivnu inflamaciju (73). BMP faktorima rasta se pripisuje uloga u nastanku mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija DM tip 2 kao posledica ateroskleroze (96). Naime, ekspresija BMP-2 utvrđena je u ćelijama ateroskleroznih lezija, a u ćelijama aorte dijabetičnih miševa je bila skoro duplirana u odnosu na kontrolne nedijabetične životinje (96, 98). Uloga u medijaciji vaskularne kalcifikacije, mineralizacije i lokalne indukcije inflamacije, i identifikacija povećane ekspresije BMP-2 u dijabetičnim tkivima ukazuje na ulogu ovog faktora rasta u komplikacijama DM.

DM i pulpa

O ćelijskim i molekularnim mehanizmima poremećaja u zubnoj pulpi u toku DM za sada se malo zna. Epidemiološke studije pokazuju da je prevalencija apeksnih periodontitisa i endodontskog tretmana veća kod pacijenata sa DM tip II i da je učestalost ekstrakcija zuba kao posledice neuspešnog endodontskog tretmana kod njih povećana (99, 100). Histopatološke studije pokazuju postojanje angiopatija i zadebljale

bazalne membrane kako malih tako i velikih krvnih sudova pulpe (101). Amatyakul i sar. su na animalnom modelu pacova sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom pokazali da je u pulpi zuba značajno manji protok krvi u odnosu na kontrolne životinje (102). Parametri antioksidantnog sistema, odgovornog za zaštitni odgovor organizma na oksidativni stres, značajno su izmenjeni u pulpi pacova sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom (103, 104). Reparatorni odgovor pulpe na istoj vrsti animalnog modela je bio inhibiran (105). Zanimljivo je napomenuti da je u dijabetičnoj pulpi, kako kod čoveka tako i na eksperimentalnom modelu pacova, zapaženo značajno prisustvo patoloških kalcifikacija (106, 107).

RADNA HIPOTEZA

Imajući u vidu značaj BMP-2 i VEGF u procesima reparacije dentina u zdravim zubima, kao i činjenicu da dijabetes u mnogim tkivima menja funkciju ovih faktora rasta, postavili smo hipotezu da dijabetes značajno menja nivo i ulogu BMP-2 i VEGF u reparatornim odgovorima pulpe.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Odrediti koncentraciju BMP-2 i VEGF u pulpi intaktnih zuba pacijenata sa DM tipa 2 i u kontrolnoj grupi zdravih ljudi.
2. Odrediti koncentraciju BMP-2 i VEGF u pulpi zuba nakon lečenja dubokog karijesa indirektnim prekrivanjem pulpe preparatima Ca(OH)_2 , kod pacijenata sa DM tipa 2 i u kontrolnoj grupi zdravih ljudi.
3. Na animalnom modelu pacova sa eksperimentalno izazvanim DM odrediti koncentraciju BMP-2 i VEGF u intaktnoj zubnoj pulpi, kao i u kontrolnoj grupi životinja i ispitati u kojoj meri ovaj animalni model može da zameni ispitivanja dijabetičnih promena u zubnoj pulpi čoveka.
4. Odrediti koncentraciju BMP-2 i VEGF u zubnoj pulpi koja je u fazi reparatnog odgovora eksperimentalno izazvanog primenom Ca(OH)_2 kao sredstvom za direktno prekrivanje pulpe (DPP), kod pacova sa eksperimentalno izazvanim DM i kontrolnih životinja.

MATERIJAL I METODE

STUDIJA NA LJUDIMA

Ispitanici i zubi uključeni u eksperiment

Ispitivanjem je obuhvaćeno 28 zdravih osoba i 28 pacijenata obolelih od DM tipa 2 kod kojih je dijagnoza ovog oboljenja postavljena najmanje godinu dana pre uključivanja u ovu studiju, a vrednost HbA1C utvrđena u periodu ne dužem od dva meseca pre uključjenja u studiju ukazivala na kontrolisanu bolest (manje od 7%, odnosno manje od 53mmol/mol). Grupu zdravih osoba sačinjavalo je 16 žena i 12 muškaraca, a grupu osoba sa dijabetesom 15 žena i 13 muškaraca. U studiju su uključeni redovni i dugogodišnji pacijenti Klinike za bolesti zuba Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu kod kojih je, iz protetskih razloga, bila indikovana devitalizacija intaktnih i zuba sa lečenim dubokim karijesom. Uključeni su samo ispitanici koji u anamnezi nisu davali podatak o postojanju bilo kakvog sistemskog oboljenja (osim dijabetesa u grupi ispitanika sa DM) i koji nisu uzimali antibiotsku i antiinflamatornu terapiju najmanje dve nedelje pre uzimanja uzoraka. Etički komitet Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu odobrio je sva istraživanja u okviru ove doktorske teze. Osobe od kojih je uziman biološki materijal, nakon pismenog upoznavanja sa ciljevima i očekivanim ishodima istraživanja kao i procedurom uzimanja uzoraka, potpisali su pristanak za učešće u istraživanju. Sa svim ispitanicima postupalo se po principima Dobre kliničke prakse (GCP).

Zubi iz kojih je uzimana pulpa za dalja istraživanja nisu pokazivali kliničke ili radiološke znake oboljenja lateralnog ili apeksnog periodoncijuma kao ni radiološke

znake internih resorpcija. Vitalitet ovih zuba kontrolisan je elektro-testom, a prag nadražaja se u odnosu na kontrolni zub iz iste funkcionalne grupe, razlikovao najviše za jedan podeok na skali aparata za ispitivanje vitaliteta (Jugodent, Novi Sad, Srbija). Zubi kod kojih je sprovedena terapija dubokog karijesa uključivani su ukoliko je u kartonu pacijenta postojao podatak da je na njima godinu dana (\pm jedan mesec) pre uzimanja uzorka pulpe sproveden postupak indirektnog prekrivanja pulpe u jednoseansnom rutinskom kliničkom postupku koji je podrazumevao: potvrdu dijagnoze dubokog karijesa isključenjem ireverzibilnog oštećenja pulpe elektro testom vitaliteta, preparaciju kaviteta i potpuno uklanjanje karijesa odgovarajućim dijamantskim i karbidnim rotirajućim instrumentima u visoko i niskoturažnim nasadnim instrumentima, kontrola potpune eliminacije karijesno promenjenog tkiva i odsustva perforacije pulpe sondiranjem standardnom stomatološkom sondom, aplikovanje preparata na bazi Ca(OH)_2 na deo kaviteta najbliži pulpi (Calcimol LC, Voco, Cuxhaven, Germany) i podloge od glasjonomer kompozitnog preparata (Ionoseal, Voco, Cuxhaven, Germany) kao i postavljanje definitivnog kompozitnog ispuna (Herculite XRV, Kerr Corp., Orange, CA, USA) prema uputstvu proizvođača u više slojeva i uz odgovarajući adheziv sa „total etch“ tehnikom nagrizanja (OptiBond Solo Plus, Kerr Corp., Orange, CA, USA). Zubi iz ove grupe su, osim pomenutog, morali da imaju jednopovršinske ispune sa svim rubovima u gleđi, bez kliničkih i radioloških znaka sekundarnog karijesa. Ispunjenost svih pomenutih uslova kontrolisao je jedan istraživač, specijalista za bolesti zuba i endodonciju, u kartonima pacijenta, kliničkim pregledom i radiografskom analizom retroalveolarnih preoperativnih snimaka uključenih zuba. Na ovaj način su formirane četiri eksperimentalne grupe: 1-pulpe intaktnih zuba kod zdravih osoba, 2-pulpe zuba sa indirektnim prekrivanjem pulpe kod zdravih osoba, 3- pulpe intaktnih zuba kod pacijenata obolelih od DM, i 4- pulpe zuba sa indirektnim prekrivanjem pulpe

kod zdravih kod pacijenata obolelih od DM. Jedan uzorak pulpe je uziman po pacijentu, a svaka grupa je imala po 14 uzoraka.

Uzimanje uzoraka

Uzorak pulpe je uziman tokom postupka vitalne ekstirpacije koju je sprovodio isti kliničar u napred opisanoj proceduri. Za lokalnu anesteziju upotrebljen je 1.8 ml 3% mepivakaina (Scandonest 3% Plain, Septodont, Paris, France), da bi se izbegao vazokonstriktor i konsektivna hipoksija pulpe. Zub je dezinfikovao vatom natopljenom 70% rastvorom etanola, a zatim i 0,2% hlorheksidina (Curasept 220, Curaden International AG, Kriens, Switzerland). Preparacija pristupnog kaviteta i trepanacija urađeni su rotirajućim dijamantskim i karbidnim instrumentima odgovarajuće veličine sa vodenim hlađenjem. Pre uzimanja uzorka iz komore pulpe obavljena je irigacija sterilnim fiziološkim rastvorom da bi se uklonili ostaci dentinskih opiljaka. Koronarni deo pulpe evakuisan je ekskavatorom, a radikalni deo pulpe ekstirpatorima odgovarajuće veličine. Po uzimanju uzorka terapijski postupak vitalne ekstirpacije je nastavljen po standardnoj proceduri. Uzorak tkiva odmah je ubačen u Ependorf epruvete (1,5 ml) kojima je prethodno određena težina. Epruvete sa tkivom su zatim ponovo izmerene, zamrznute u tečnom azotu, a zatim prebačene u hladnjak na -70°C gde su čuvane do daljih postupaka. Merenja težine obavljena su na AdventurerTM digitalnoj vagi (OHAUS, Corp., Pine Brook, NJ, USA). Težina uzorka određena je oduzimanjem ukupne težine epruvete i uzorka od težine prazne epruvete.

STUDIJA NA ŽIVOTINJAMA

Eksperimentalno izazvani DM

Ispitivanja su izvedena na 40 pacova Wistar soja, oba pola, telesne težine 250 do 300 g. Tokom eksperimenta pacovi su čuvani u kavezima sa po 5 životinja. Na raspolaganju su im bili sveža voda za piće i hrana *ad libitum*. Životinje su tokom eksperimenta čuvane po principima Evropske konvencije za zaštitu životinja koje se koriste u eksperimentima i za druge naučne razloge (CoE-ETS 123). Životinje su podeljene u dve grupe. Kontrolnu grupu sačinjavalo je 20 zdravih životinja. Eksperimentalna grupa se sastojala od dvadeset jedinki sa eksperimentalno izazvanim DM jednom intraperitonealnom dozom (60 mg/kg) streptozotocina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) *ex tempore* rastvorenog u sterilnom fiziološkom rastvoru (108, 109). Kontrolna grupa životinja dobila je istu zapreminu sterilnog fiziološkog rastvora. Prvog dana nakon davanja streptozotocina i neposredno pre žrtvovanja, aparatom GlucoSure Plus i Touch-In test trakama (Apex Biotechnology Corp., Taiwan) određen je nivo glukoze u krvi, uzetoj iz vene repa. Kao prazni nivo za hiperglikemiju uzeto je 11 mmol/l prema protokolu Garber i sar. (105).

Operativna procedura i uzimanje uzoraka

Za analize su upotrebljene pulpe maksilarnih i mandibularnih centralnih inciziva. Četvrtog dana nakon davanja streptozotocina, u opštoj anesteziji postignutoj intramuskularnom injekcijom 20 mg/kg tiletamin-zolazepam kombinacije (Zoletil 100, Virbac, Carros, France), sprovedene su procedure preparacije kaviteta sa ekspanzijom pulpe, DPP i postavljanja definitivnog ispuna. Nakon fiksiranja glave životinje, usna duplja je dezinfikovana 0,2% hlorheksidinom (Curasept 220, Curaden International AG, Kriens, Switzerland), a zubi još i brisanjem vatom natopljenom 70% rastvorom etanola. Operativne procedure su sprovedene na desnim incizivima, dok su levi bili kontrolni i ostali su intaktni. Na distalnim površinama desnih gornjih i donjih inciziva svake životinje okruglim karbidnim svrdlima odgovarajuće veličine i sa vodenim hlađenjem preparisani su kaviteti, usmereni ka radiksu, do dubine tačkaste perforacije pulpe. Hemostaza pulpne rane uspostavljena je kompresijom sterilnom kuglicom vate natopljene fiziološkim rastvorom. Nakon sušenja kaviteta sterilnom vatom, pulpa je prekrivena čvrsto vezujućim kalcijum hidroksidnim preparatom Life (Kerr Corp., Orange, CA, USA), a kavitet je definitivno zatvoren kompozitnim materijalom Vertise (Kerr Corp., Orange, CA, USA) u svemu prema uputstvu proizvođača. Prvog i sedmog dana nakon DPP po 10 životinja iz obe grupe je eutanazirano toksičnom dozom (100 mg/kg, intraperitonealno) tiopental-Na (Trapanal, Nycomed, Konstanz, Germany) i od njih su uzeti uzorci zdrave i pulpe tretiranih zuba. Zubi su najpre ekstrahovani ekskavatorima, prepolovljeni uzdužno oštrim srpastim instrumentom, i pulpa evakuisana stomatološkom sondom. Jedan uzorak tretirane pulpe sačinjavale su pulpe desnih, gornjih i donjih centralnih inciziva jedne životinje, a uzorak zdrave pulpe

sačinjavale su pulpe levih, gornjih i donjih centralnih inciziva iste životinje. Tkivo je odmah stavljeno u individualne Ependorf epruvete. Prethodno su precizno izmerene težine epruvete radi kasnijeg određivanja težine uzorka u postupku kao sa uzorcima u studiji na ljudima. Epruvete sa uzorkom odmah su zamrznute u tečnom azotu, a zatim prebačene u hladnjak, gde su čuvane na -70°C do daljih postupaka. Ovime je dobijeno osam grupa sa po 10 uzoraka pulpe: 1. zdrava pulpa tretirana preparatom $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -prvi dan, 1a. kontrola-zdrava pulpa prvog dana, 2. zdrava pulpa tretirana preparatom $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -sedmi dan, 2a. kontrola-zdrava pulpa sedmog dana 3. dijabetična pulpa tretirana preparatom $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -prvi dan, 3a. kontrola-dijabetična pulpa prvog dana, 4. dijabetična pulpa tretirana preparatom $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -sedmi dan i 4a. kontrola- dijabetična pulpa sedmog dana.

IMUNOESEJ ZA KVANTIFIKACIJU VEGF I BMP-2

Priprema uzoraka

Nakon odmrzavanja u individualne epruvete sa humanim i animalnim uzorcima ubačena je odgovajuća količina (500 μl /10mg tkiva- uputstvo proizvođača) pufera za lizu tkiva, obezbeđenim u kompletima za analize VEGF faktora rasta (RayBiotech Inc, Norcross, GA, USA). Tkivo je zatim manuelno homogenizovano staklenim štapićima odgovarajuće veličine, u individualnim epruветama na temperaturi od 4°C . Nakon ovoga, lizat je centrifugiran na 5000g u trajanju od 10 min. u mikrocentrifugi Heraeus* Biofuge Primo R (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Izdvojeni

supernatant za svaki uzorak je zatim podeljen u dve Ependorf posude: a) alikot za analizu nivoa VEGF i b) alikot za analizu nivoa BMP-2. Do analiza supernatanti su čuvani na -70°C .

Ekperimentalni protokol za ELISA

Kvantitativna utvrđivanja nivoa VEGF i BMP-2 u lizatima humanih i životinjskih tkiva sprovedena su sendvič ELISA („Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) imunoeesejskom tehnikom.

Tehniku ELISA su konceptualizovali i razvili Perlmann i Engvall-ova sa Univerziteta u Stokholmu tokom sedamdesetih godina 20-tog veka. Prvi rad o ovoj tehnici u kome su predstavili kvantifikaciju IgG u serumu zeca oni su publikovali 1971. godine (110). Bilo je potrebno dosta vremena da se tehnika usavrši i počne da se koristi u istraživačke i dijagnostičke svrhe. Broj radova u PubMed citatnoj bazi koji je povezan sa korišćenjem ELISA počeo je dramatično da raste tokom 90-tih godina dvadesetog veka, a ovaj trend porasta zadržan je i do danas (111).

ELISA je vrsta biohemijske analize koja se koristi za kvalitativno i kvantitativno određivanje supstanci, obično proteina, u heterogenim rastvorima. Ukoliko ispitivana supstanca nije u rastvoru (npr. nalazi se u tkivu), ona se mora prevesti u tečnu fazu da bi mogao da se primeni ELISA metod. U ovom istraživanju tkivo je lizirano i tako prevedeno u tečni oblik pogodan za ispitivanje. Osnova ovog analitičkog postupka je imunohemijska reakcija antigen-antitelo. Esej se obično dizajnira tako da se ispitivana supstanca ponaša kao antigen koji se tokom analize vezuje za njemu specifično

primarno antitelo prisutno u analitičkom sistemu formirajući kompleks antigen-antitelo. Količina stvorenih kompleksa proporcionalna je količini prisutnog antigena koji se ispituje. Da bi se utvrdilo prisustvo i količina kompleksa antigen-antitelo uvodi se sekundarno antitelo za koje je vezan (konjugovan) enzim kao „reporterni“ molekul. Funkcija enzima je da učini ovaj kompleks detektabilnim. Naime u reakciji rastvor se u ovoj fazi dodaje enzimu specifičan supstrat koji u reakciji menja boju. Intenzitet boje biće izraženiji što je veća količina prisutnog enzima. Obzirom da je intenzitet enzimske reakcije definisan količinom stvorenog kompleksa primarno antitelo-antigen–sekundarno antitelo ovo predstavlja osnovu za preciznu kvantitativnu procenu posmatrane supstance. Merenjem intenziteta svetlosti određene talasne dužine propuštene kroz reakciji rastvor dobija se fizička osnova za izračunavanje prisustva ili koncentracije posmatrane supstance (112). Postoji više tipova ELISA eseja, a u ovoj studiji su korišćeni sendvič eseji sa solidnom (čvrstom) fazom. Kod ovog tipa eseja primarno antitelo je imobilisano za čvrsti zid reakcione komore, i sa ispitivanom supstancom i sekundarnim antitelom formira isto tako imobilisan „sendvič“.

Za određivanje nivoa VEGF u ljudskoj pulpi upotrebljen je komercijalni ELISA komplet RayBio[®] Human VEGF ELISA Kit (RayBiotech Inc, Norcross, GA, USA). Nivoi VEGF u pulpi pacova određeni su upotrebom komercijalnog ELISA kompleta RayBio[®] Rat VEGF ELISA Kit (RayBiotech Inc, Norcross, GA, USA). Koncentracije BMP-2 u ljudskoj pulpi i pulpi pacova utvrđeni su upotrebom komercijalnog ELISA kompleta Quantikine[®] BMP-2 Immunoassay (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). Postupak je sproveden u svemu prema uputstvu proizvođača. Biohemijske reakcije su se odvijale na mikrotitracionim pločicama obezbeđenim u okviru korišćenih kompleta. Svaka mikrotitraciona pločica je imala 96 reakcionih komora pokrivenih

imobilisanim primarnim antitelima za odgovarajući faktor rasta. U svaku komoru je ubačena propisana količina uzorka ili standarda. Nakon propisanog vremena inkubacije, u reakcionarne komore uliveno je sekundarno antitelo i ponovo inkubirano. U BMP-2 kompletima sekundarno antitelo proizvođač je konjugovao enzimom peroksidaza iz rena. U VEGF kompletima sekundarno antitelo nije prethodno konjugovano enzimom već je vezano za biotin. Zato postoji dodatni korak kada se dodaje enzim, takođe peroksidaza rena, konjugovana sa streptavidinom koji ima veliki afinitet za biotin i tako se vezuje za prethodno formirani kompleks. Nakon ispiranja dodat je rastvor peroksidaznog supstrata a to je u svim korišćenim esejima 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin. Pod dejstvom enzima ovo jedinjenje menja boju u plavu, pri čemu intenzitet boje zavisi od koncentracije posmatranog faktora rasta u uzorku. U poslednjem koraku svih korišćenih eseja enzimska reakcija je prekidana 2N sumpornom kiselinom, pri čemu se boja reakcionih rastvora menjala iz različitih intenziteta plave u različite intenzitete žute boje. Očitavanje absorbanci, odnosno optičkih gustina (OD) rastvora urađeno je odmah po prekidu reakcija na aparatu Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Izračunavanje koncentracija posmatranih faktora rasta izvršeno je na osnovu standardnih kriva konstruisanih za svaki izvedeni esej. Naime, u odgovarajuće reakcione komore mikrotitracionih pločica pipetirani su i rastvori analiziranih faktora rasta poznatih koncentracija u serijskom razblaženju i dobijene njihove OD. Korišćenjem programa Sigma Plot 12 (SyStat Software Inc, IL, USA) određena je formula standardne krive koja najbolje reprezentuje dobijene vrednosti i pomoću nje su na osnovu izmerenih OD izračunate nepoznate koncentracije posmatranih faktora rasta u uzorcima. Za svaki uzorak (i standard) su sprovedena dva merenja i krajnja koncentracija uzorka (standarda) izračunata je kao njihova srednja vrednost. Nivoi ispitivanih proteina prikazani su po jedinici težine pulpe.

STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Metode deskriptivne statistike korišćene za opis posmatranih uzoraka su srednje vrednosti, standardne greške srednjih vrednosti (SEM), standardne devijacije, medijane, interkvartilne razlike, 5. i 95. percentili i ekstremne vrednosti. Obzirom da vrednosti posmatranih parametara u studiji na ljudima nisu pokazivale normalnu raspodelu (Shapiro-Wilk test, $P < 0.05$), za njihovu analizu upotrebljeni su neparametarski statistički testovi. Razlike između zdravih i dijabetičnih subjekata po pitanju starosti analizirane su Mann-Whitney-evim, a po pitanju pola χ^2 testom. Kruskal-Wallis test sa Student-Newman-Keuls korekcijom za multiple komparacije je upotrebljen za poređenje razlika između eksperimentalnih grupa u nivoima VEGF i BMP-2. Međuzavisnost VEGF i BMP-2 koncentracija ocenjena je Spearman-ovom korelacijom rangova. Vrednosti posmatranih parametara u studiji na pacovima pokazivale su normalnu raspodelu (Shapiro-Wilk test, $P > 0.05$), a posmatrane grupe homogene varijanse pa su za poređenje razlika upotrebljeni t test, kao i jednofaktorska i trofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Holm-Sidakovim testom za višestruku komparaciju. Međuzavisnost VEGF i BMP-2 koncentracija ocenjena je Pearson-ovom korelacijom. Za poređenja vrednosti i korelacije VEGF i BMP-2 koncentracija u pulpi intaktnih zuba ljudi i eksperimentalnih životinja korišćeni su Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney test i Spearman-ov test korelacije rangova. Analize su rađene statističkim softverom Sigma Plot 12 (SyStat Software Inc, IL, USA), a P vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

REZULTATI

STUDIJA NA LJUDIMA

Demografske karakteristike ispitanika

Zdravi ispitanici uključeni u studiju, u vreme uzimanja uzoraka imali su od 33 do 62 godine, a prosečna starost ove grupe bila je 48,3 godine. Najmlađi ispitanik oboleo od DM imao je 42, a najstariji 69 godina. Prosečna starost u ovoj grupi bila je 54,1 godina. Između ove dve grupe ispitanika nije utvrđena statistički značajna razlika u pogledu starosne strukture (Mann-Whitney test, $P=0,603$).

Veća zastupljenost osoba ženskog pola karakteristika je obe ispitivane grupe (57,1% kod zdravih subjekata i 53,6% kod subjekata obolelih od DM, Tabela 1). Između dve grupe ispitanika nije utvrđena statistički značajna razlika po pitanju polne zastupljenosti (χ^2 test, $P=0,806$).

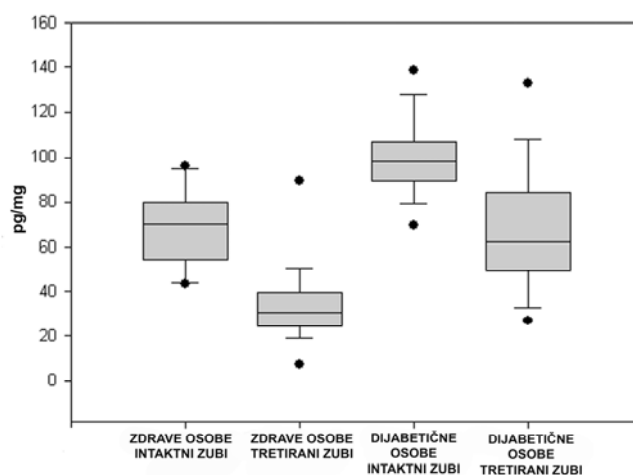
U grupi ispitanika sa DM vrednost glikozilisanog hemoglobina A1c bila je $6,1 \pm 0,8\%$ (srednja vrednost \pm standardna devijacija)

Tabela 1. Polna zastupljenost ispitanika

	Zdrave osobe	Osobe sa DM
Žene	16	15
Muškarci	12	13
UKUPNO	28	28

Koncentracije VEGF u pulpi

Deskriptivni statistički parametri ispitivanih grupa u vezi koncentracija VEGF u pulpi prikazani su na grafikonu 1. Kruskal-Wallis-ov test je ukazao na prisustvo statistički značajnih razlika između ispitivanih grupa ($P < 0,001$).



Grafikon 1. VEGF koncentracije u posmatranim grupama - parametri deskriptivne statistike. Horizontalne linije-medijane, pravougaonici-interkvartilne razlike, vertikalne linije sa platoon-5. i 95. percentil, tačke-ekstremne vrednosti.

Tkivne koncentracije VEGF su kod zdravih osoba u pulpi intaktnih zuba bile za 98,8% veće nego u pulpi zuba sa lečenim dubokim karijesom. Kod dijabetičnih pacijenata, VEGF koncentracija u pulpi zdravih zuba je za 49,6% bila veća u odnosu na pulpu tretiranih zuba. Između ove dve grupe utvrđena je statistički značajna razlika (Student-Newman-Keuls test višestruke komparacije, $P < 0,05$). Poređenje koncentracije VEGF u pulpi intaktnih zuba zdravih i dijabetičnih pacijenata, kao i u pulpi tretiranih zuba zdravih i dijabetičnih pacijenata pokazalo je da između njih postoje statistički

značajne razlike (respektivno za 49,1% odnosno za 92,2% veće kod zuba osoba sa DM; Student-Newman-Keuls test višestruke komparacije, $P < 0,05$, Tabela 2).

Tabela 2. Koncentracije VEGF u tkivu pulpe kod ljudi (pg/mg pulpnog tkiva)

Ispitanici	Intaktni zubi		Tretirani zubi	
	N	VEGF koncentracija	N	VEGF koncentracija
	Srednja vrednost± S.E.M.		Srednja vrednost± S.E.M.	
Zdravi	14	68.0±4.6 ^{a,b}	14	34.2±4.9 ^b
Dijabetični	14	101.4±5.0 ^a	14	67.8±8.2

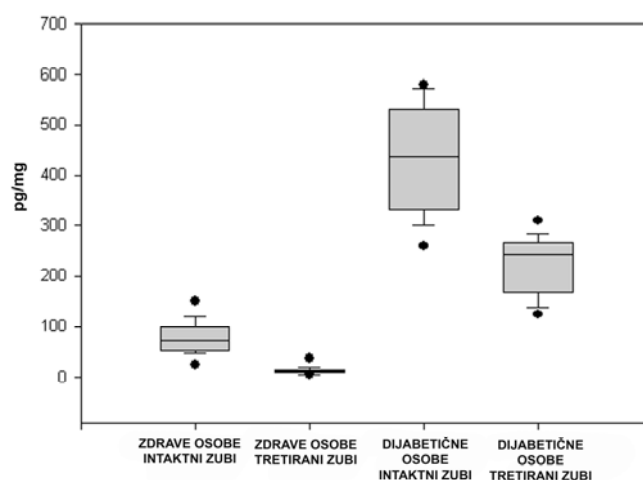
^a Statistički značajna razlika u odnosu na drugu grupu u istom redu tabele (Student-Newman-Keuls post hoc test, $P < 0,05$)

^b Statistički značajna razlika u odnosu na drugu grupu u istoj koloni tabele (Student-Newman-Keuls post hoc test, $P < 0,05$)

S.E.M.- standardna greška srednje vrednosti

Koncentracije BMP-2 u pulpi

Statistički parametri koji opisuju ispitivane grupe u vezi sa utvrđenim koncentracijama BMP-2 dati su na grafikonu 2. Kruskal-Wallis-ov test je ukazao na prisustvo statistički značajnih razlika između ispitivanih grupa ($P < 0,001$).



Grafikon 2. BMP-2 koncentracije u posmatranim grupama - parametri deskriptivne statistike. Horizontalne linije-medijane, pravougaonici-interkvartilne razlike, vertikalne linije sa platoon-5. i 95. percentil, tačke-ekstremne vrednosti.

Tabela 3. Koncentracije BMP-2 u tkivu pulpe kod ljudi (pg/mg pulpnog tkiva)

Ispitanici	Intaktni zubi		Tretirani zubi	
	N	BMP-2 koncentracija	N	BMP-2 koncentracija
		Srednja vrednost± S.E.M.		Srednja vrednost± S.E.M.
Zdravi	14	77.4±8.8 ^{a,b}	14	14.3±2.1 ^b
Dijabetični	14	436.3±28.0 ^a	14	222.6±15.2

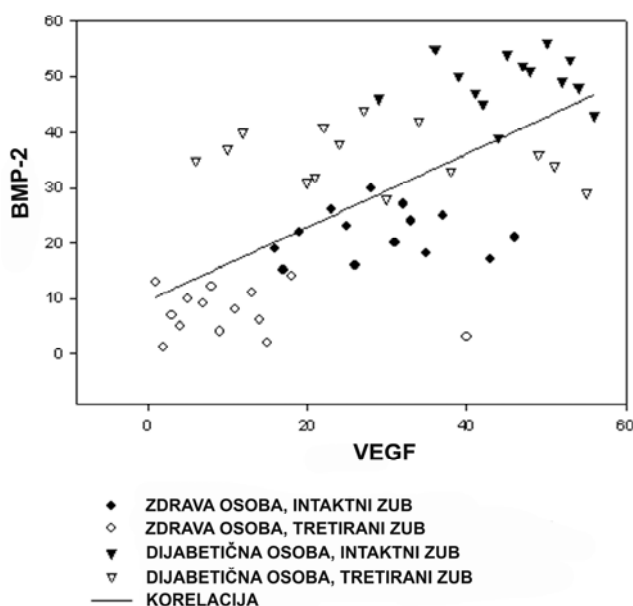
^a Statistički značajna razlika u odnosu na drugu grupu u istom redu tabele (Student-Newman-Keuls post hoc test, P<0,05)

^b Statistički značajna razlika u odnosu na drugu grupu u istoj koloni tabele (Student-Newman-Keuls post hoc test, P<0,05)

S.E.M.- standardna greška srednje vrednosti

Zdravi pacijenti su imali 5,4 puta veću tkivnu koncentraciju BMP-2 u pulpi intaktnih zuba u odnosu na pulpu tretiranih zuba. U grupi osoba sa dijabetesom zabeležen je 96% veći nivo BMP-2 u pulpi intaktnih zuba u odnosu na pulpu tretiranih zuba, što je statistički značajno različito u odnosu na zdrave osobe (Student-Newman-Keuls test višestruke komparacije, $P < 0,05$). BMP-2 koncentracije su u pulpi intaktnih zuba bile 5,6 puta veće kod dijabetičnih u odnosu na zdrave osobe, dok su nivoi ovog faktora rasta u tretiranim zubima dijabetičara bili, čak 15,6 puta veći nego u ovim zubima zdravih osoba. Za razlike između ovih grupa je takođe utvrđeno da su statistički značajne (Student-Newman-Keuls test višestruke komparacije, $P < 0,05$; Tabela 3).

Korelacija koncentracija VEGF i BMP-2 u zubnoj pulpi



Grafikon 3. Dijagram raspršenosti VEGF i BMP-2 nivoa individualnih uzoraka (predstavljeno rangovima).

Nivoi VEGF i BMP-2 u 56 uzoraka ispitivane pulpe pokazali su snažnu pozitivnu korelaciju koja je utvrđena Spearman-ovim koeficijentom korelacije ($R_s = 0.678$, $P < 0.001$, grafikon 3).

STUDIJA NA ŽIVOTINJAMA

Karakteristike eksperimentalno izazvanog DM

Između zdravih i životinja sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom utvrđeno je postojanje statistički značajnih razlika u vrednostima glikemije i telesne težine (ANOVA, $P < 0,001$; Tabela 4). Početne vrednosti glikemije u grupi zdravih životinja i grupi životinja sa indukovanim DM statistički se nisu značajno razlikovale (Holm-Sidakov test višestruke komparacije, $P = 0,19$). Međutim, već 24 sata po indukciji DM prosečna glikemija je veća za 2,48 mmol/l što je statistički značajan porast (Holm-Sidakov test višestruke komparacije, $P < 0,001$). Krajnje vrednosti glikemije su statistički značajno više kako u odnosu na početne i vrednosti 24 sata po indukciji DM, tako i u odnosu na nivoe kod zdravih životinja (Holm-Sidakov test višestruke komparacije, $P < 0,001$, Tabela 4). Razlika između krajnjih vrednosti glikemije kod životinja sa indukovanim DM koje su žrtvovane prvog i sedmog dana nakon prekrivanja pulpe ($11,04 \pm 0,09$ mmol/l i $11,68 \pm 0,14$ mmol/l) statistički je značajna ali sa manjom verovatnoćom u odnosu na prethodno pomenute razlike u nivoima glikemije (t test, $P = 0,005$).

Dok je u grupi zdravih životinja, tokom eksperimentalnog perioda, došlo do blagog porasta telesne težine kod životinja sa indukovanim DM ona je padala te je

krajnja vrednost statistički značajno niža u odnosu na ostale izmerene vrednosti težine (Holm-Sidakov test višestruke komparacije, $P < 0,05$). Razlika između krajnjih vrednosti telesne težine kod životinja sa indukovanim DM koje su žrtvovane prvog i sedmog dana nakon prekrivanja pulpe ($252 \pm 10,2$ g i $240 \pm 7,1$ g) nije statistički značajna (t test, $P = 0,326$).

Tabela 4. Glikemija i telesna težina kod eksperimentalnih životinja

Eksperimentalne životinje	Glikemija (mmol/l)	Težina (g)
Indukovani DM		
Početne vrednosti	$5,04 \pm 0,11^{a,b,d}$	$277 \pm 5,78^b$
24 h po indukciji	$7,52 \pm 0,14^{b,c,d}$	$270 \pm 8,17^{b,d}$
Krajnje vrednosti	$11,36 \pm 0,13^{c,d}$	$246 \pm 6,18^{c,d}$
Zdrave		
Početne vrednosti	$5,28 \pm 0,13$	$287 \pm 4,96$
Krajnje vrednosti	$5,6 \pm 0,12$	$299 \pm 3,70$

Vrednosti su izražene u obliku: srednja vrednost \pm SEM

^a statistički značajna razlika (Holm-Sidakov post-hok test, $P < 0,05$) u odnosu na vrednost 24h po indukciji

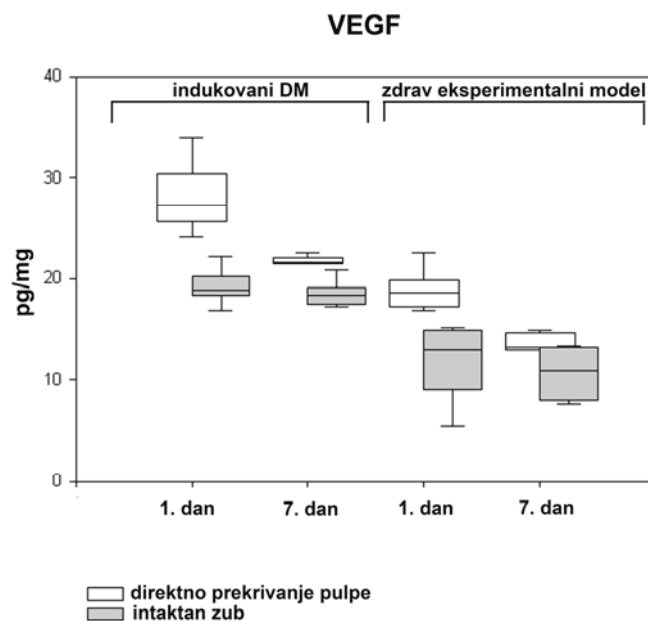
^b statistički značajna razlika (Holm-Sidakov post-hok test, $P < 0,05$) u odnosu na krajnju vrednost kod životinja sa indukovanim DM

^c statistički značajna razlika (Holm-Sidakov post-hok test, $P < 0,05$) u odnosu na početnu vrednost kod zdravih životinja

^d statistički značajna razlika (Holm-Sidakov post-hok test, $P < 0,05$) u odnosu na krajnju vrednost kod zdravih životinja

Koncentracije VEGF

Deskriptivni statistički parametri ispitivanih grupa u vezi koncentracija VEGF u pulpi eksperimentalnih životinja prikazani su na grafikonu 4.



Grafikon 4. VEGF koncentracije u posmatranim grupama - parametri deskriptivne statistike. Horizontalne linije-medijane, pravougaonici-interkvartilne razlike, vertikalne linije sa platoon-5. i 95. percentil, tačke-ekstremne vrednosti.

Kod životinja sa eksperimentalno izazvanim DM koncentracija VEGF u pulpi zuba prvi dan nakon DPP je bila za 46,1% veća u poređenju sa intaktanim zubom i 29,4% veća u odnosu na vrednost sedmog dana po DPP, što su statistički značajne razlike (Holm-Sidakov test višestruke komparacije, $P < 0,05$). Slično ovome, i kod zdravih eksperimentalnih životinja nivo VEGF u pulpi prvog dana nakon DPP je bio 61,5% i 38% veći u odnosu na intaktan zub i zub sedam dana posle DPP, što je takođe statistički značajno (Holm-Sidakov test višestruke komparacije, $P < 0,05$). Vrednosti koncentracije VEGF su bile statistički značajno veće u svim grupama životinja sa

indukovanim DM u odnosu na istoimene grupe kod zdravih životinja (od 49,2% do 72,95% veće, Holm-Sidakov test višestruke komparacije, $P < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5. Vrednosti VEGF (pg/mg tkiva) u pulpi intaktnih zuba i zuba sa direktnim prekrivanjem pulpe, prvog i sedmog dana tretmana, kod zdravih životinja i životinja sa indukovanim DM.

Eksperimentalne životinje	1. dan		7. dan	
	Intaktni zub	DPP	Intaktni zub	DPP
Zdrave	11,7±1,8	18,9±1,0 ^{a,b}	10,7±1,2	13,7±0,4
Indukovani DM	19,3±0,9 ^c	28,2±1,7 ^{a,b,c}	18,5±0,6 ^c	21,8±0,2 ^c

Vrednosti su izražene u obliku: srednja vrednost±SEM

^a statistički značajna razlika (Holm-Sidakov post-hok test, $P < 0,05$) u odnosu na intaktni zub iste grupe životinja u istom vremenskom periodu

^b statistički značajna razlika (Holm-Sidakov post-hok test, $P < 0,05$) u odnosu na DPP sedmog dana kod iste grupe životinja

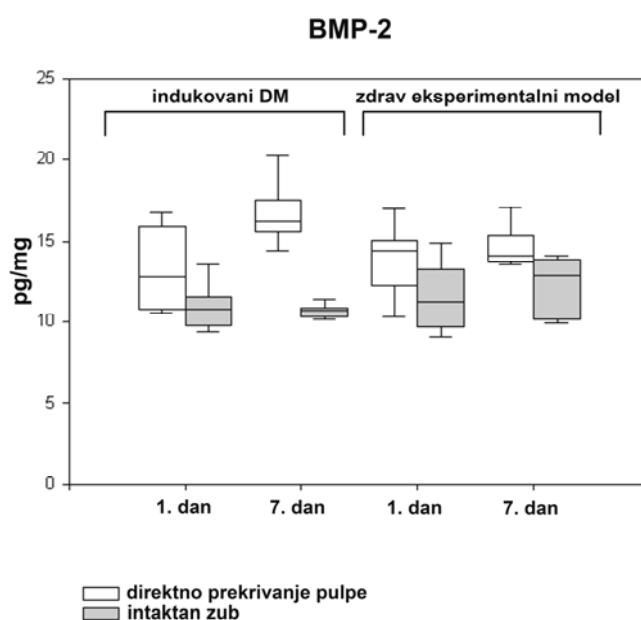
^c statistički značajna razlika (Holm-Sidakov post-hok test, $P < 0,05$) u odnosu na istoimenu grupu kod zdravih životinja

Faktorska analiza varijanse je ukazala na prisustvo statistički značajnih razlika između ispitivanih grupa nastalih uticajem indukovanog DM, terapijske procedure DPP i vremena proteklog nakon njenog sprovođenja ($P < 0,001$). Statistički značajna interakcija je utvrđena između uticaja terapijske procedure DPP i vremena (prvi i sedmi dan) proteklog nakon njenog sprovođenja (višefaktorska ANOVA, $P = 0,004$). Efekti

indukovanog DM nezavisni su kako od uticaja DPP (višefaktorska ANOVA, $P=0,528$), tako i od vremena proteklog nakon izvođenja DPP (višefaktorska ANOVA, $P = 0,748$).

Koncentracije BMP-2

Statistički parametri koji opisuju ispitivane grupe u vezi sa utvrđenim koncentracijama BMP-2 u pulpi eksperimentalnih životinja dati su na grafikonu 5.



Grafikon 5. BMP-2 koncentracije u posmatranim grupama - parametri deskriptivne statistike. Horizontalne linije-medijane, pravougaonici-interkvartilne razlike, vertikalne linije sa platoon-5. i 95. percentil, tačke-ekstremne vrednosti.

Tabela 6. Vrednosti BMP-2 (pg/mg tkiva) u pulpi intaktnih zuba i zuba sa direktnim prekrivanjem pulpe, prvog i sedmog dana tretmana, kod zdravih životinja i životinja sa indukovanim DM.

Eksperimentalne životinje	1. dan		7. dan	
	Intaktni zub	DPP	Intaktni zub	DPP
Zdrave	11,6±1,0	13,8±1,1	12,2±0,9	14,7±0,6
Indukovani DM	10,9±0,7	13,3±1,3	10,7±0,2	16,7±1,0 ^a

Vrednosti su izražene u obliku: srednja vrednost±SEM

^a statistički značajna razlika (Holm-Sidakov post-hok test, $P < 0,05$) u odnosu na intaktni zub u istom vremenskom intervalu

Indukovani DM je faktor koji nije pokazao statistički značajan uticaj na nivo BMP-2 u eksperimentalnom periodu (višefaktorska ANOVA, $P = 0,808$). Nasuprot ovome, terapijski postupak DPP je ispoljio statistički značajan uticaj na nivo BMP-2 (višefaktorska ANOVA, $P < 0,001$). U grupi životinja sa indukovanim DM nivo BMP-2 u pulpi sedmog dana nakon DPP bio je 56,1% veći u odnosu na intaktan zub što je statistički značajna razlika (Holm-Sidakov test višestruke komparacije, $P = 0,001$). Koncentracije BMP-2 u pulpi prvog i sedmog dana nakon postupka DPP nisu se statistički značajno razlikovale između eksperimentalnih grupa (višefaktorska ANOVA, $P = 0,079$). Indukovani DM, DPP i uticaj posmatranog vremena proteklog nakon izvođenja ovog terapijskog postupka (prvi odnosno sedmi dan) nisu ispoljili statistički značajne interakcije u eksperimentalnom periodu (indukovani DM u odnosu na DPP: $P = 0,156$; indukovani DM u odnosu na prvi i sedmi dan nakon DPP: $P = 0,522$; DPP u

odnosu na vreme (prvi i sedmi dan) proteklo nakon sprovođenja ove procedure: $P=0,136$; višefaktorska ANOVA)(Tabela 6).

Korelacije nivoa VEGF i BMP-2

Između nivoa VEGF i BMP-2 u ispitivanom uzorku nije otkrivena statistički značajna korelacija ($r=0,130$; $P=0,422$; Pearson-ov test korelacije).

KORELACIJA KONCENTRACIJA VEGF I BMP-2 U PULPI INTAKTNIH ZUBA LJUDI I EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA

Apsolutne vrednosti koncentracije VEGF, kao i vrednosti koncentracije BMP-2 u pulpi intaktnih zuba kod ljudi (zdravih i dijabetičnih) odnosno pacova (zdravih i dijabetičnih) statistički se značajno razlikuju (Kruskal-Wallis-ov test, $P<0,001$) i nisu u korelaciji (Spearman-ov test korelacije, $P>0,05$). Koncentracije VEGF u pulpi intaktnih zuba kod ljudi pokazale su relativni porast od prosečno 49% kod ispitanika sa DM u odnosu na zdrave ispitanike, što se statistički značajno razlikuje od prosečnog relativnog porasta (68%) koncentracija VEGF u pulpi intaktnih zuba životinja sa eksperimentalno izazvanim DM u odnosu na zdrave jedinke (Mann-Whitney test, $P<0,05$). Koncentracije BMP-2 u pulpi intaktnih zuba kod ljudi pokazale su relativni porast od oko 460% kod ispitanika sa DM u odnosu na zdrave ispitanike, dok su za razliku od ovoga, koncentracije BMP-2 u pulpi intaktnih zuba kod životinja sa eksperimentalno izazvanim DM u odnosu na zdrave jedinke zabeležen manji pad (oko 9%). Pomenute

relativne promene koncentracije BMP-2 statistički se značajno razlikuju (Mann-Whitney test, $P < 0,001$)

DISKUSIJA

Postoje brojni eksperimentalni i klinički podaci koji ukazuju da se u raznim tkivima, a posebno u krvnim sudovima nivoi i dejstva VEGF i BMP-2 značajno menjaju pod uticajem DM (38, 96, 97, 113). Imajući ovo u vidu sprovedena je studija na ljudima sa ciljem da se kvantifikuju vrednosti ovih faktora rasta u zubnoj pulpi zdravih osoba i osoba obolelih od DM. S obzirom da je statistička analiza ukazala na homogenost ispitivane populacije po pitanju pola i starosti, dobijeni podaci ne pokazuju eventualne razlike u nivoima ispitivanih faktora rasta vezane za pol ili starost.

Ćelije zubne pulpe ljudi spontano stvaraju VEGF (53, 114), a *in vitro* stimulacija proinflamatornim citokinima ili hipoksijom dovodi do pospešivanja produkcije ovog faktora rasta (52, 55). Pokazano je da bakterije i bakterijski produkti izazivaju povećanu ekspresiju VEGF u ćelijama pulpe (56-60). Do danas nema objavljenih podataka o kvantifikaciji VEGF u zdravom i patološki izmenjenom tkivu zubne pulpe. Rezultati ove studije dobijeni ELISA imunoesejom kao kvantitativnom metodom, pokazali su da je koncentracija VEGF u pulpi intaktnih zuba zdravih ispitanika bila 68 pg/mg tkiva. U vezi sa ovim, zanimljivo je napomenuti da su Tran-Hung i sar. našli, u studiji metodološki različitoj od ove, da je koncentracija VEGF u supernatantima dobijenim iz kulture intaktnih ćelija ljudske pulpe 769 pg/ml (53). Roberts Clark i Smith su, ispitujući sadržaj raznih angiogenih faktora rasta u rastvorljivoj frakciji dentina, našli koncentraciju VEGF od 63 pg/mg (22). Činjenica da su zabeleženi nivoi VEGF u oba tkiva skoro isti ide u prilog fiziološkom konceptu (6) da su pulpa i dentin funkcionalno povezani i stoga integrisani u pulpo-dentinski kompleks.

Detaljne studije o promenama zubne pulpe kod osoba obolelih od dijabetesa su ograničene i odnose se na zapažene angiopatije velikih i malih krvnih sudova uglavnom u centralnoj zoni pulpe (101), postojanje većeg broja intrapulpnih kalcifikacija (106) i manjeg uspeha endodontskih postupaka (99, 100). Leite i sar. su u dve studije pokazali značajne promene antioksidantnog sistema pulpe kod pacova sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom što vodi izmenjenim reakcijama na AGE i slobodne radikale (103, 104). Laboratorijske i kliničke studije su jasno pokazale da razni faktori oksidativnog stresa, direktno i indirektno, stimulišu stvaranje VEGF u ishemičnom tkivu nastalom pod uticajem DM (39, 55, 113). Zabeležene povećane vrednosti koncentracije VEGF u pulpi intaktnih zuba osoba sa dijabetesom u odnosu na pulpu zdravih osoba, najverovatnije su u vezi sa promenama u tkivu pulpe izazvanim oksidativnim stresom.

Iako postoji više istraživanja koja potvrđuju ekspresiju BMP-2 u ćelijama zubne pulpe zdravih ljudi (78, 79), ovakvih podataka nema za pulpu osoba obolelih od DM. Koliko je do sada poznato, ovo je prva studija koja pokazuje da je nivo BMP-2 u pulpi intaktnih zuba viši kod dijabetičnih u odnosu na zdrave osobe. U vezi sa ovim treba napomenuti da postoje nalazi koji ukazuju na povećanu ekspresiju BMP-2 u drugim tkivima izazvanu oksidativnim stresom, što ukazuje na značajnu ulogu ovog faktora rasta u razvoju mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija DM tip 2 nastalih kao posledica ateroskleroze (96, 115). Stoga se može pretpostaviti da su povećani nivoi BMP-2 u zubnoj pulpi osoba sa DM tip 2 zapaženi u ovoj studiji, nastali kao posledica oksidativnog stresa prisutnog u zubnoj pulpi usled DM. Imajući u vidu sposobnost BMP-2 da izazove ektopičnu kalcifikaciju tkiva (73), klinički nalazi koji ukazuju na veću učestalost intrapulpnih kalcifikacija kod dijabetičnih u odnosu na zdrave osobe (106) mogu se objasniti povećanom koncentracijom BMP-2 u dijabetičnoj pulpi.

Cilj indirektog prekrivanja pulpe je aktivacija tercijarne dentinogeneze što povećava debljinu dentinskog sloja između dna kaviteta i ispuna. Vrsta i intenzitet dentinostimulativnih procesa nastalih nakon ovog terapijskog postupka zavise od faktora kao što su primarna veličina lezije (karijesne, traumatske) i debljina preostalog dentina, preparaciona trauma, delovanje sredstva za prekrivanje i materijala za ispun (116, 117). S obzirom da intenziteti ovih faktora mogu da variraju primarni odontoblasti ispod preparisanog kaviteta mogu jednim delom i da odumru pa se ne može precizno definisati da li je reakcija pulpe reaktivna dentinogeneza, reparativna dentinogeneza ili kombinacija ova dva procesa. Tercijarna dentinogeneza, nastala kao reakcija na povredu različitog intenziteta uključuje ćelijsku inflamatornu reakciju, angiogenezu i bilo povećanje sekretorne aktivnosti odontoblasta ili nastanak i migraciju odontoblastima sličnih ćelija i izazivanje njihove sekretorne aktivnosti (18). Svi ovi procesi uključuju VEGF i BMP-2 kao važne signalne molekule (118). S obzirom da postoji podatak da se proces tercijarane dentinogeneze skoro zaustavlja 130-tog dana po otpočinjanju (119), za kvantifikaciju VEGF i BMP-2 odabran je period od jedne godine nakon prekrivanja pulpe kao vreme kada se sekretorne aktivnosti pulpe najverovatnije vraćaju u normalno stanje nakon reakcije na povredu. Utvrđeno je da su nivoi VEGF i BMP-2 u jednogodišnjem periodu nakon prekrivanja značajno manji u odnosu na intaktne zube. Ovakav trend postoji i kod dijabetičnih pacijenata. Može se pretpostaviti da su zapaženi sniženi nivoi VEGF i BMP-2 povezani sa postreparatornim funkcionalnim sposobnostima pulpe. Naime, postoji stanovište da se nakon reparatornog odgovora pulpno tkivo razlikuje od originalnog, više ili manje je aberantno, postaje fibrotično, često sa pulpolitima ili difuznim mineralizacijama (120). U vezi sa ovim zanimljivo je pomenuti da su smanjene ekspresije VEGF i BMP zabeležene u pulpi intaktnih zuba starijih osoba (121), za koju je utvrđeno da ima smanjenu vaskularnu i nervnu mrežu,

smanjen broj odontoblasta sa redukovanom sekretornom aktivnosti što ukazuje na značajno redukovanu vitalnost i reparatorni kapacitet ove pulpe (122). Jaka pozitivna korelacija između nivoa VEGF i BMP-2 utvrđena na posmatranim uzorcima pulpe ukazuje na povezane uloge ovih faktora rasta u reakcijama zdrave i dijabetične pulpe.

Rezultati studije na ljudima pokazuju da su nivoi VEGF i BMP-2 viši kod pacijenata sa DM u odnosu na zdrave ispitanike, i da su koncentracije ovih faktora rasta niže kod zuba sa indirektnim prekrivanjem pulpe u odnosu na intaktne zube. Ovi rezultati mogu biti od kliničkog značaja prilikom planiranja tretmana koji zavise od reakcija pulpnog tkiva, i imaju za cilj da se očuva njen vitalitet, posebno u pacijenata sa dijabetesom. Može se, naime, pretpostaviti da porast VEGF i BMP-2 u pulpi dijabetičnih pacijenata dovodi do povećanog broja hiperpermeabilnih krvnih sudova što dovodi do štenog ireverzibilnog povećanja intrapulpnog pritiska. Sa druge strane, smanjenje nivoa ovih faktora rasta ukazuje na, nalik promenama kod starenja pulpe, smanjenu sposobnost adekvatnog odgovora na štetne nadražaje pulpe koja je u prošlosti ispoljila reparatorne reakcije. Iako nisu ispitivane direktne uloge ovih faktora rasta u dijabetičnoj pulpi, njihova kvantifikacija je od značaja za buduće terapijske pristupe. Naime, rezultati ove studije ukazuju na sličnost u povećanim nivoima VEGF između dijabetične pulpe i retine kod koje se anti-VEGF terapija već primenjuje (38).

Embriološke, anatomske i fiziološke sličnosti tkiva i organa kod glodara i ljudi (123), kao i njihova dostupnost, čine pacove vrlo čestim eksperimentalnim modelom za proučavanje dijabetesnih promena. Denticiju pacova čine dva inciziva u frontalnom delu i po tri molara bočno u svakoj vilici. Molari odraslih životinja imaju završen rast korena i anatomski su slični ljudskim molarima ali su izrazito manjih dimenzija. Incizivi su kod pacova zubi koji kontinuirano niču, zbog čega ih karakteriše masivna pulpa u odnosu na njihovu veličinu i imaju nezavršen rast korena. Iako se po tome ovi zubi

razlikuju od ljudskih, oni su se pokazali kao koristan model za evaluaciju biohemijskih promena u pulpi kod dijabetesa (103, 104, 124), sposobnosti diferencijacije stem ćelija pulpe (125), *in vivo* i *in vitro* reakcija pulpe na bioaktivne molekule i faktore rasta (51, 126-128). Zbog kontinuirane i intenzivne dentinogeneze u sekutićima pacova mi smo, takođe, izabrali ove zube kao model za ispitivanje koncentracije VEGF i BMP-2 kao faktora rasta od velikog značaja za reparatorni odgovor pulpe. Brojne histološke opservacije reparatornih procesa u pulpi pacova nakon DPP preparatima kalcijum hidroksida ukazuju na uporedivost ili čak istovetnost sa reparatornim procesima u ljudskoj pulpi, što upućuje na opravdanost upotrebe animalnog modela pacova i za studije na pulpi (129). Tako je Gängler u svom predlogu trostepenog modela za ispitivanje biokompatibilnosti materijala za dentalnu upotrebu, preporučio zubnu pulpu pacova za evaluaciju akutne toksičnosti (129). Veliki je broj studija koje koriste zube pacova za evaluaciju sredstava i postupaka za prekrivanje pulpe (81, 105, 130-133) kao i tkivnih odgovora i reakcija pulpe (51, 107).

Streptozotocin je antibiotik sa citotoksičnim dejstvom na β ćelije pankreasa (134), koji se vrlo često koristi za indukciju dijabetesa kod eksperimentalnog modela pacova. Postoji više supstanci koje imaju citotoksično dejstvo na β ćelije pankreasa (aloksan, ditizon, oksin...). U odnosu na njih, međutim, streptozotocin daje manja oštećenja bubrega i jetre. Takođe, metabolizam pacova sa dijabetesom indukovanim streptozotocinom je vrlo sličan metabolizmu ljudi obolelih od DM (135). Ovo su razlozi zbog kojih je u ovoj studiji za indukciju dijabetesa upotrebljen streptozotocin.

Rezultati studije na životinjama, pokazali su da su nivoi VEGF u intaktnim zubima pacova sa DM viši u odnosu na zdrave jedinke. Ovo je u skladu sa našim nalazima dobijenim na pulpi kod ljudi. Povećana ekspresija VEGF pokazana je i u drugim tkivima pacova sa indukovanim ili urođenim dijabetesom. Kvantifikacije VEGF

sprovedene ELISA postupkom u studijama Bucolo i sar. i Ma i sar. pokazale su povećane koncentracije VEGF u retinama dijabetičnih pacova u odnosu na zdrave (136, 137). Povećana ekspresija VEGF, progresivno povezana sa stepenom hiperglikemije, dokazana je i u tkivu aorti pacova kao eksperimentalnih modela kako za DM tip 1 tako i za DM tip 2 (138). Štaviše, uočeno je da čak i blaga hiperglikemija u kratkom vremenskom periodu od 24 sata dovodi do značajnih povećanja koncentracija VEGF u kulturi ljudskih aortnih endotelnih ćelija (138), što je u skladu sa podatkom da do povećanog stvaranja AGE u endotelnim ćelijama dolazi već tokom prve nedelje delovanja hiperglikemije (93). U uslovima hipoksije indukovane replantacijom zuba, imunohistohemijski je pokazano da tkivo pulpe pacova pokazuje povećanu ekspresiju VEGF. Ovo se uočava već prvog dana po replantaciji, a povećana ekspresija je bila izražena u endotelnim ćelijama, fibroblastima i odontoblastima površne zone pulpe (139). Leite i sar. su na eksperimentalnom modelu dijabetesa kod pacova u zubnoj pulpi inciziva utvrdili povećanje koncentracija većeg broja markera oksidativnog stresa (103, 104). Interesantan je i nalaz Aranha i sar. koji su na modelu hipoksije u kulturi tkiva pulpnih ćelija inciziva pacova pokazali povećanje ekspresije VEGF (52). Imajući u vidu pomenute nalaze vrlo je verovatno da je značajan porast VEGF u pulpi intaktnih zuba dijabetičnih pacova, u odnosu na zdrave životinje, posledica hipoksije koja prati DM kao i smanjene sposobnosti pulpe da se odupre oksidativnom stresu.

Naši rezultati pokazuju da, za razliku od VEGF, nema značajne promene koncentracije BMP-2 u pulpi intaktnih zuba pacova pod uticajem dijabetesa. Interesantno je istaći da to nije slučaj sa drugim tkivima. Naime, endotelne ćelije aorte ljudi, pacova i miševa pokazuju, dozno zavisni porast nivoa BMP-2 vezan za stepen hiperglikemije, *in vivo* i *in vitro* (96, 138). Nasuprot ovome, smanjena ekspresija BMP-2 utvrđena je u nervnim ćelijama mijenteričnog pleksusa dijabetičnih pacova (140).

Imajući u vidu činjenicu da postoji značajna razlika u koncentracijama BMP-2 u tkivu pulpe intaktnih zuba kod zdravih i pacijenata sa DM tip 2, nepostojanje ovakve razlike kod zubne pulpe pacova moglo bi se pripisati nedovoljnoj dužini trajanja dijabetesa, u našem slučaju 5 i 12 dana.

Veliki broj eksperimentalnih studija (105, 130-133) pokazuju da na modelu pacova kalcijum hidroksid vrlo efikasno izaziva reparatornu dentinogenezu što je dobro dokumentovano uglavnom histološkim studijama, ali je malo podataka o signalnim molekulama koje učestvuju u ovim procesima. Rezultati naše studije na životinjama pokazuju da već prvog dana nakon prekrivanja pulpe preparatom na bazi $\text{Ca}(\text{OH})_2$ koncentracija VEGF u pulpi značajno raste u odnosu na koncentraciju kod intaktnih zuba, kako kod zdravih tako i kod dijabetičnih životinja. Ovo je u saglasnosti sa histološkim nalazima dobijenim posle DPP sa kalcijum hidroksidom koji pokazuju da se u zubnoj pulpi pacova već u prva 24 h ispod sloja nekroze pojavljuje zona reaktivnog zapaljenja sa karakterističnim povećanjem endotelnih ćelija i fibroblasta (130-133). Sedmog dana nakon DPP koncentracije VEGF i dalje su povišene, ali ne značajno u odnosu na intaktnu pulpu, što je u skladu sa smanjenjem stepena proliferacije endotelnih ćelija između trećeg i sedmog dana po prekrivanju uočenom u histološkim studijama (131, 132). Što se tiče BMP-2 naši rezultati pokazuju da se porast koncentracije ovog faktora rasta pojavljuje tek sedmog dana nakon DPP. U vezi sa ovime, značajan je nalaz da je imunohistohemijski pokazano prisustvo malog broja ćelija pulpe pacova pozitivnih na BMP-2 tek sedmog dana nakon prekrivanja, sa vremenski zavisnom tendencijom porasta 14. i 28. dana (81). BMP-2 ima sposobnost da indukuje diferencijaciju pulpnih ćelija u odontoblastima slične ćelije (82), kao što su Höhl-ove ćelije (141), koje su uočene sedmog dana nakon DPP kod pacova dodatno pokazujući pojačanu proliferaciju (131, 132). Orhan i sar. su, dodatno, utvrdili u pulpi inciziva pacova kontinuirani porast

odontoblastima sličnih ćelija od 7. do 28. dana nakon DPP (127). Izraženiji porast koncentracije BMP 2 u grupi sa indukovanim DM sedmog dana nakon prekrivanja pulpe verovatno je rezultat udruženog delovanja progresije reparatornih procesa i dijabetesa.

Između koncentracije VEGF i BMP-2 u pulpnom tkivu animalnog modela pacova u ovoj studiji nije utvrđena korelacija. U vezi sa ovime interesantan je nalaz Bostrom i sar. koji su u in vitro studiji utvrdili da ekspresija BMP-2 pod uticajem hiperglikmije ima drugačiji vremenski okvir u odnosu na ekspresiju VEGF (138).

Imajući u vidu činjenicu da dobijeni rezultati ne pokazuju korelaciju između koncentracija VEGF i BMP-2 u fiziološkim i dijabetičnim uslovima u intaktnoj pulpi kod ljudi i kod prikazanog animalnog modela može se zaključiti da u ovom slučaju dijabetes ne izaziva istovrsne promene koncentracija posmatranih faktora rasta. Ovo može biti u vezi sa činjenicama da je metabolizam pacova intenzivan, da se biološki procesi odvijaju brže i da je pulpa reaktivnija kod ovih životinja u odnosu na ljude (129, 142).

Rezultati ove studije bi mogli da posluže kao osnova za terapijsku primenu ovih faktora rasta ili njihovih antagonista za korekciju oslabljenih reparatornih sposobnosti pulpe tokom DM. Ovo stoga što se u pojedinim granama medicine, na primer, u oftalmologiji, već koriste antagonisti VEGF kao lekovi za korigovanje komplikacija DM (38). BMP-2 sa uspehom se koristi u ortopediji za pospešivanje zarastanja koštanih defekata kritične veličine, kod nesrastanja koštanih fragmenata, kao i u hirurgiji kičmenog stuba (143).

ZAKLJUČCI

1. Koncentracije VEGF i BMP-2 su značajno povećane u pulpi intaktnih zuba pacijenata sa DM tipa 2 u odnosu na pulpu intaktnih zuba kod zdravih ljudi.
2. U pulpi zuba kod kojih je sprovedeno lečenje dubokog karijesa preparatom Ca(OH)_2 , godinu dana nakon ove terapije koncentracije VEGF i BMP-2 su značajno manje u odnosu na pulpu intaktnih zuba kako kod zdravih osoba tako i kod pacijenata sa DM tip 2.
3. Eksperimentalno izazvani DM je značajno uticao na povećanje koncentracija VEGF u pulpi intaktnih zuba na animalnom modelu pacova.
4. Koncentracija BMP-2 u pulpi intaktnih zuba na animalnom modelu pacova sa eksperimentalno izazvanim DM i u pulpi intaktnih zuba kod kontrolne grupe životinja se ne razlikuje značajno.
5. Dijabetes ne izaziva istovrsne promene koncentracija posmatranih faktora rasta u pulpi intaktnih zuba kod ljudi i na prikazanom eksperimentalnom modelu pacova.
6. Prvog dana nakon DPP preparatom Ca(OH)_2 koncentracije VEGF u pulpi tretiranih zuba značajno su veće u odnosu na pulpu intaktnih zuba kako kod zdravih tako i kod eksperimentalnih životinja sa indukovanim DM. U ovom vremenskom periodu koncentracije BMP 2 nisu se značajno promenile u eksperimentalnim grupama.
7. Sedmog dana nakon DPP preparatom Ca(OH)_2 , kod eksperimentalnih životinja, koncentracije VEGF u pulpi tretiranih zuba su značajno niže u odnosu na prvi dan, ali i dalje blago povišene u odnosu na pulpu intaktnih zuba. Koncentracije BMP 2 su kod eksperimentalnih životinja sedmog dana nakon DPP preparatom Ca(OH)_2 blago povišene u pulpi tretiranih u odnosu na pulpu intaktnih zuba, a ovo je posebno izraženo u grupi sa indukovanim DM.

8. Zabeležene promene u koncentracijama VEGF i BMP-2 u pulpi tokom i nakon odbrambenih reakcija kod ljudi i na animalnom modelu ukazuju na značajnu ulogu ovih faktora rasta u reparatornim odgovorima pulpe.

LITERATURA

1. Harichane Y, Hirata A, Dimitrova-Nakov S, Granja I, Goldberg A, Kellermann O, et al. Pulpal Progenitors and Dentin Repair. *Advances in Dental Research* 2011;23:307-312.
2. Trowbridge H, Kim S. Pulp Development, Structure, and Function. U: Cohen S, Burns R, urednici. *Pathways of the Pulp*. St. Louis: Mosby, Inc; 1998. p. 386-424.
3. Mathews B, Andrew D. Microvascular architecture and exchange in teeth. *Microcirculation* 1995;2:305-313.
4. Stojić D, Roganović J, Brković B. Funcionality of orofacial branches feeding: salivary glands, dental pulp and intraoral anesthetic field. U: *Advances in Medicine and Biology*. New York: Nova Publishers; 2012. str. 59-96.
5. Nakashima M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2005;16:369-376.
6. Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 1996;7:104-133.
7. Byers M, Sugaya A. Odontoblast processes in dentin revealed by fluorescent Di-I. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1995;43:159-168.
8. Smith A. Pulpal Responses to Caries and Dental Repair. *Caries Research* 2002;36:223-232.
9. Mjor I. *Dentin and Pulp*. U: *Reaction Paterns in Human Teeth*. Florida: CRC Press; 1983.str. 63-156.
10. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 1993;4:679-728.
11. Smith A, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch J, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *International Journal of Devevelopmental Biology* 1995;39:273-280.

12. Lesot H, Begue-Kirn C, Kubler MD, Meyer JM, Smith AJ, Cassidy N, et al. Experimental induction of odontoblast differentiation and stimulation during reparative processes. *Cells and Materials* 1993;3:201-217.
13. Smith A, Tobias R, Cassidy N, Plant C, Browne R, Begue-Kirn C, et al. Odontoblast stimulation in ferrets by dentin matrix components. *Archives of Oral Biology* 1994;39:13-22.
14. Smith A, Murray P, Lumley P. Preserving vital pulp in operative dentistry: I. A biological approach. *Dental Update* 2002;29:64-69.
15. Inage T, Toda Y. Gene expression of TGF- β 1 and elaboration of extracellular matrix using in situ hybridization and EM radioautography during dentinogenesis. *Anatomical Records* 1996;245:250-266.
16. Sloan A, Perry H, Matthews J, AJ S. Transforming growth factor-B isoform expression in mature human molar teeth. *Histochemical Journal* 2000;32:247-252.
17. Smith A, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis-embryonic events as a template for dental tissue repair. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 2001;12:425-437.
18. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *Journal of Dentistry* 2000;28:77-92.
19. Cassidy N, Fathey M, Prime S, Smith A. Comparative analysis of transforming growth factor β isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. *Archives of Oral Biology* 1997;42:219-223.
20. Smith A, Patel M, Graham LW, Sloan A, Cooper PR. Dentin regeneration: Key roles for stem cells and molecular signalling. *Oral Biosciences and Medicine* 2005;2/3:127-132.

21. Rutherford RB, Spanberg L, Tucker M, Charete m. Transdental stimulation of reparative dentine formation by osteogenic protein-1 in monkeys. *Archives of Oral Biology* 1995;40:681-683.
22. Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Archives of Oral Biology* 2000;45:1013-1016.
23. Lesot H, Smith A, Tziafas D, Begue-Kirn C, N C, Ruch J. Biologically active molecules and dental tissue repair: a comparative review of reactionary and reparative dentinogenesis with the induction of odontoblast differentiation in vitro. . *Cells and Materials* 1994;4:199-218.
24. Rutherford RB, Wahle J, Tucker M, Rueger D, Charete M. Induction of reparative dentin formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Archives of Oral Biology* 1993;38:571-576.
25. Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, Reddi AH. Regulatory Role of Transforming Growth Factor- β , Bone Morphogenetic Protein-2, and Protein-4 on Gene Expression of Extracellular Matrix Proteins and Differentiation of Dental Pulp Cells *Developmental Biology* 1994;162:18-28.
26. Goldberg A, Farges J, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup Fea. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacological Research* 2008;58:137-147.
27. Paula-Silva F, Ghosh A, Silva L, Kapila Y. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. *Journal of Dental Research* 2009;88:339-344.
28. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *Journal of Dentistry* 2010;38:687-697.

29. Folkmann J, Shing Y. Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 1992;267:1093-1114.
30. Magloire H, Joffre A, Bleicher F. An in vitro model of human dental repair. *Journal of Dental Research* 1996;75:1971-1978.
31. Zhang R, Cooper PR, Smith G, Nor JE, Smith AJ. Angiogenic Activity of Dentin Matrix Components. *Journal of Endodontics* 2011;37:26-30.
32. Matsushita K, Motani R, Sakuta T, Nagaoka S, Matsuyama T, Abeyama K, et al. Lipopolysaccharide enhances the production of vascular endothelial growth factor by human pulp cells in culture. *Infection and Immunity* 1999;67:1633-1639.
33. Senger D, Galli S, Dvorak A, Perruzzi C, Harvey V, Dvorak H. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-985.
34. Ferrara N, Henzel W. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1989;161:851-858.
35. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews* 2004;25:581-611.
36. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996;93:1493-1495.
37. Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical Pharmacology* 2002;64:993-998.
38. Wroblewski B, Wong TY, Simo R. Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Progress in Retinal and Eye Research* 2008;27:608-621.

39. Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD. Angiogenesis - a new target for future therapy. *Vascular Pharmacology* 2006;44:265-274.
40. Guerrin M, Moukadiri H, Chollet P, Moro F, Dutt K, Malecaze F, et al. Vasculotropin/ vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for human retinal pigment epithelial cells cultured in vitro. *Journal of Cellular Physiology* 1995;164:385-394.
41. Matsushita K, Motani R, Sakuta T, Yamaguchi N, Koga T, Matsuo K, et al. The role of Vascular Endothelial Growth Factor in human dental pulp cells: induction of chemotaxis, proliferation, and differentiation and activation of the AP-1-dependent signaling pathway. *Journal of Dental Research* 2000;79:1596-1603.
42. Yang R, Thomas G, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, et al. Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1996;27:838-844.
43. Park J, Chen H, Winer J, Houck K, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269:25646-25654.
44. Mattuella LG, Bento LW, de Figueiredo JAP, Nor JE, de Araujo FB, Fossati ACM. Vascular endothelial growth factor and its relationship with the dental pulp. *Journal of Endodontics* 2007;33:524-530.
45. Mattuella LG, de Figueiredo JAP, Nor JE, de Araujo FB, Fossati ACM. Vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in the pulp of human primary and young permanent teeth. *Journal of Endodontics* 2007;33:1408-1412.

46. Artese L, Rubini C, Ferrero G, Fioroni M, Santinelli A, Piattelli A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in healthy and inflamed human dental pulps. *Journal of Endodontics* 2002;28:20-23.
47. Guven G, Altun C, Gunhan O, Gurbuz T, Basak F, Akbulut E, et al. Co-expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in inflamed human pulp: An immunohistochemical study. *Journal of Endodontics* 2007;33:18-20.
48. Aida M, Irie T, Aida T, Tachikawa T. Expression of protein kinases C betaI, betaII, and VEGF during the differentiation of enamel epithelium in tooth development. *Journal of Dental Research* 2005;84:234-239.
49. Miwa Y, Fujita T, Sunohara M, Saito I. Immunocytochemical localisation of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 of the human deciduous molar tooth germ development in the human fetus. *Annals of Anatomy* 2008;190:246-251.
50. Wang Q, Lin X, Lin Z, Liu G, Shan X. Expression of vascular endothelial growth factor in dental pulp of immature and mature permanent teeth in human. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2007;16:285-289.
51. Fletcher A, Bregman C, Woicke J, Salcedo T, Zidell R, Janke H, et al. Incisor degeneration in rats induced by vascular endothelial growth factor/fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase inhibition. *Toxicologic Pathology* 2010;38:267-279.
52. Aranha AMF, Zhang ZC, Neiva KG, Costa CAS, Hebling J, Nor JE. Hypoxia Enhances the Angiogenic Potential of Human Dental Pulp Cells. *Journal of Endodontics* 2010;36:1633-1637.
53. Tran-Hung L, Laurent P, Camps J, About I. Quantification of angiogenic growth factors released by human dental cells after injury. *Archives of Oral Biology* 2008;53:9-13.

54. Mantellini MG, Botero T, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nor JE. Adhesive resin and the hydrophilic monomer HEMA induce VEGF expression on dental pulp cells and macrophages. *Dental Materials* 2006;22:434-440.
55. Chu SC, Tsai CH, Yang SF, Huang FM, Su YF, Hsieh YS, et al. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by proinflammatory cytokines in human pulp and gingival fibroblasts. *Journal of Endodontics* 2004;30:704-707.
56. Yang LC, Tsai CH, Huang FM, Su YF, Lai CC, Liu CM, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression in human pulp fibroblasts stimulated with black-pigmented Bacteroides. *International Endodontic Journal* 2004;37:588-592.
57. Botero TM, Mantellini MG, Song WY, Hanks CT, Nor JE. Effect of lipopolysaccharides on vascular endothelial growth factor expression in mouse pulp cells and macrophages. *European Journal of Oral Sciences* 2003;111:228-234.
58. Botero TM, Shelburne CE, Holland GR, T Hanks C, Nor JE. TLR4 mediates LPS-induced VEGF expression in odontoblasts. *Journal of Endodontics* 2006;32:951-955.
59. Botero TM, Son JS, Vodopyanov D, Hasegawa M, Shelburne CE, Nor JE. MAPK Signaling Is Required for LPs-induced VEGF in Pulp Stem Cells. *Journal of Dental Research* 2010;89:264-269.
60. Soden RI, Botero TM, Hanks CT, Nor JE. Angiogenic Signaling Triggered by Cariogenic Bacteria in Pulp Cells. *Journal of Dental Research* 2009;88:835-840.
61. Mullane EM, Dong Z, Sedgley CM, Hu JCC, Botero TM, Holland GR, et al. Effects of VEGF and FGF2 on the Revascularization of Severed Human Dental Pulp. *Journal of Dental Research* 2008;87:1144-1148.
62. Urist M. Bone formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-899.

63. Wozney J, Rosen V, Celeste A, Mitsock L, Whitters M, Kriz r, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988;242:1528-1534.
64. Rao G, Loffler C, Wozney J, Hansmann I. The gene for bone morphogenetic protein 2A(BMP2A) is localised to human chromosome 20p12 by radioactive and nonradioactive in situ hybridization. *Human Genetics* 1992;90:299-302.
65. Sebald W, Nickel J, Zhang J, Mueller D. Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/receptor interaction. *Biological Chemistry* 2004;385:697-710.
66. Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2009;20:343-355.
67. Nie X, Luukko K, Kettunen P. BMP signalling in craniofacial development. *International Journal of Developmental Biology* 2006;50:511-521.
68. Chen Y, Hata A, Lo R, Wotton D, Shi Y, Pavletic N, et al. Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes and Development* 1998;12:2144-2152.
69. Chen D, Zhao m, Mundy G. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004;22:233-241.
70. Hruska K, Mathews S, Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circulation Research* 2005;97:105-114.
71. Chen D, Harris M, Rossini G, Dunstan C, Dallas S, Feng J, et al. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, 4 and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcified Tissue International* 1997;60:283-290.

72. Sandhu H. Bone morphogenetic proteins and spinal surgery". *Spine* 2003;28:S64-S73.
73. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification - Pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circulation Research* 2006;99:1044-1059.
74. David L, Feige J, Bailly S. Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2009;20:203-212.
75. Aberg T, Wozney J, Thesleff I. Expression patterns of bone morphogenetic proteins (bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Developmental Dynamics* 1997;210:383-396.
76. Nakashima M. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic protein (bmp)-2 and -4. *Journal of Dental Research* 1994;73:1515-1522.
77. Nakashima M, Reddi A. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nature Biotechnology* 2003;21:1025-1032.
78. Gu K, Smoke RH, Rutherford RB. Expression of genes for bone morphogenetic proteins and receptors in human dental pulp. *Archives of Oral Biology* 1996;41:919-923.
79. Takeda K, Oida S, Goseki M, Limura T, Maruoka Y, Amagasa T, et al. Expression of bone morphogenetic protein genes in the human dental pulp cells. *Bone* 1994;15:467-470.
80. Toyono T, Nakashima M, Kuhara S, Akamine A. Expression of TGF- β superfamily receptors in dental pulp. *Journal of Dental Research* 1997;76:1555-1560.
81. Kaida H, Hamachi T, Anan H, Maeda K. Wound healing proces of injured pulp tissues with Emdogain gel. *Journal of Endodontics* 2008;34:26-30.

- 82.** Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. *Journal of Endodontics* 2004;30:205-208.
- 83.** Nakashima M. Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. *Archives of Oral Biology* 1994;39:1085-1089.
- 84.** Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araujo FB, Shi S, Nor JE. Dentin-derived BMP-2 and Odontoblast Differentiation. *Journal of Dental Research* 2010;89:603-608.
- 85.** Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *Journal of Dental Research* 2004;83:590-595.
- 86.** Yang X, Walboomers F, van den Beucken J, Bian Z, Fan M, Jansen J. Hard tissue formation of STRO-1-selected rat dental pulp stem cells in vivo. *Tissue Engineering:Part A* 2009;15:367-375.
- 87.** Qin W, Yang F, Deng R, Li DD, Song Z, Tian YG, et al. Smad 1/5 Is Involved in Bone Morphogenetic Protein-2-induced Odontoblastic Differentiation in Human Dental Pulp Cells. *Journal of Endodontics* 2012;38:66-71.
- 88.** Qin W, Lin Z, Deng R, Li D, Song Z, Tian Y, et al. p38a MAPK is involved in BMP-2-induced odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. *International Endodontic Journal* 2012;45:224-233.
- 89.** Yang W, Harris MA, Cui Y, Mishina Y, Harris SE, Gluhak-Heinrich J. Bmp2 Is Required for Odontoblast Differentiation and Pulp Vasculogenesis. *Journal of Dental Research* 2012;91:58-64.

90. Miley D, Terezhalmay G. The patient with diabetes mellitus: Etiology, epidemiology, principles of medical management, oral disease burden, and principles of dental management. *Quintessence International* 2005;36:779-794.
91. Rakočević I, Miljuš D, Plavšić S, urednici. Incidencija i mortalitet od dijabetesa u Srbiji 2008. Beograd: Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut"; 2009.
92. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. U: *Diabetes Care*. 2004. str. S5-S10.
93. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-820.
94. Hsueh W, Law R. Cardiovascular risk continuum: implications of insulin resistance and diabetes. *American Journal of Medicine* 1998;105:4S-14S.
95. Williams S, Goldfine A, Timimi F, Ting H, Roddy M, Simonson D, et al. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilatation in humans in vivo. *Circulation* 1998;97:1695-1701.
96. Nett PC, Ortmann J, Celeiro J, Haas E, Hofmann-Lehmann R, Tornillo L, et al. Transcriptional regulation of vascular bone morphogenetic protein by endothelin receptors in early autoimmune diabetes mellitus. *Life Sciences* 2006;78:2213-2218.
97. Duh E, Aiello LP. Vascular endothelial growth factor and diabetes - The agonist versus antagonist paradox. *Diabetes* 1999;48:1899-1906.
98. Towler D, Bidder M, Latifi T, Coleman T, Semenkovich C. Diet-induced diabetes activates an osteogenic gene regulatory program in the aortas of low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:30427-30434.

- 99.** Lopez-Lopez J, Jane-Salas E, Estrugo-Devesa A, Velasco-Ortega E, Martin-Gonzalez J, Segura-Egea JJ. Periapical and Endodontic Status of Type 2 Diabetic Patients in Catalonia, Spain: A Cross-sectional Study. *Journal of Endodontics* 2011;37:598-601.
- 100.** Wang CH, Chueh LH, Chen SC, Feng YC, Hsiao CK, Chiang CP. Impact of Diabetes Mellitus, Hypertension, and Coronary Artery Disease on Tooth Extraction after Nonsurgical Endodontic Treatment. *Journal of Endodontics* 2011;37:1-5.
- 101.** Russel B. The dental pulp in diabetes mellitus. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* 1967;70:319-320.
- 102.** Amatyakul S, Chakraphan D, Chotpaibulpan S, Patumray S. The effect of long-term supplementation of vitamin C on pulpal blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2003;29:313-319.
- 103.** 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;43:959-967.
- 104.** Leite MF, Ganzerla E, Marques MM, Nicolau J. Diabetes induces metabolic alterations in dental pulp. *Journal of Endodontics* 2008;34:1211-1214.
- 105.** Garber SE, Shabahang S, Escher AP, Torabinejad M. The Effect of Hyperglycemia on Pulpal Healing in Rats. *Journal of Endodontics* 2009;35:60-62.
- 106.** Bender IB, Bender AB. Diabetes mellitus and the dental pulp. *Journal of Endodontics* 2003;29:383-389.
- 107.** Inagaki Y, Yoshida K, Ohba H, Seto H, Kido J, Haneji T, et al. High glucose levels increase osteopontin production and pathologic calcification in rat dental pulp tissues. *Journal of Endodontics* 2010;36:1014-1020.

- 108.** Badavi M, Abedi H, Dianat M, Sarkaki A. Exercise training and grape seed extract co-administration improve endothelial dysfunction of mesenteric vascular bed in STZ-induced diabetic rats. *International Journal of Pharmacology* 2011;7:813-820.
- 109.** Cotter M, Jack A, Cameron N. Effects of the protein kinase C β inhibitor LY333531 on neural and vascular function in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clinical Science* 2002;103:311-321.
- 110.** Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971;8:871-874.
- 111.** Lequin R. Enzyme immunoassay (EIA)/ enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical Chemistry* 2005;51:2415-2418.
- 112.** Voller A, Bartlett A, Bidwell D. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of Clinical Pathology* 1978;31:507-520.
- 113.** Flyvbjerg A, Khatir DS, Jensen LNJ, Dagnaes-Hansen F, Gronbaek H, Rasch R. The involvement of growth hormone (GH), insulin-like growth factors (IGFs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in diabetic kidney disease. *Current Pharmaceutical Design* 2004;10:3385-3394.
- 114.** Tran-Hung L, Mathieu S, About I. Role of human pulp fibroblasts in angiogenesis. *Journal of Dental Research* 2006;85:819-823.
- 115.** Dalfino G, Simone S, Porreca S, Cosola C, Balestra C, Manno C, et al. Bone morphogenetic protein-2 may represent the molecular link between oxidative stress and vascular stiffness in chronic kidney disease. *Atherosclerosis* 2010;211:418-423.
- 116.** About I, Murray PE, Franquin JC, Remusat M, AJ S. The effect of cavity restoration variables on odontoblast cell numbers and dental repair. *Journal of Dentistry* 2001;29:109-117.

- 117.** Murray PE, About I, Franquin JC, Remusat M, AJ S. Restorative pulpal and repair responses. *Journal of American Dental Association* 2001;132:482-491.
- 118.** About I. Dentin regeneration in vitro. The pivotal role of supportive cells. *Advances in Dental Reserch* 2011;23:320-324.
- 119.** Stanley HR, White CL, McCray L. The rate of tertiary (reparative) dentin formation in human tooth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1966;21:180-189.
- 120.** Goldberg M. Pulp Healing and Regeneration. More Questions than Answers. *Advances in Dental Research* 2011;23:270-274
- 121.** Tranasi M, Sberna MT, Zizzari V, D'Apollito G, Mastrangelo F, Salini L, et al. Microarray Evaluation of Age-related Changes in Human Dental Pulp. *Journal of Endodontics* 2009;35:1211-1217.
- 122.** Murray PE, Stanley HR, Mathews JB. Age-related odontometric changes of human teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 2002;93:474-482.
- 123.** Seki Y, Williams L, Vuguin PM, Charron MJ. Minireview: Epigenetic Programming of Diabetes and Obesity: Animal Models. *Endocrinology* 2012;153:1031-1038.
- 124.** Catanzaro O, Dziubecki D, Lauria L, CM C, RR R. Diabetes and its effect on dental pulp. *Journal of Oral Science* 2006;48:195-199.
- 125.** Zhang W, Walboomers XF, Wolke JGC, Bian Z, Fan MW, Jansen JA. Differentiation ability of rat postnatal dental pulp cells in vitro. *Tissue Engineering* 2005;11:357-368.

- 126.** Hu J, Zhang C, Yun S, Qian Q, Ranly D. Platelet derived growth factor-BB and epidermal growth factor as pulp capping medicament in rat incisors. *Journal of Hard Tissue Biology* 1997;6:121-129.
- 127.** Orhan EO, Maden M, Senguven B. Odontoblast-like cell numbers and reparative dentine thickness after direct pulp capping with platelet-rich plasma and enamel matrix derivative: a histomorphometric evaluation. *International Endodontic Journal* 2012;45:317-325.
- 128.** Sloan A, Smith A. Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor-beta isoforms1-3 in vitro. *Archives of Oral Biology* 1999;44:149-156.
- 129.** Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Laboratory Animals* 2010;44:1-6.
- 130.** Dammaschke T, Stratmann U, Fischer RJ, Sagheri D, Schafer E. A histologic investigation of direct pulp capping in rodents with dentin adhesives and calcium hydroxide. *Quintessence International* 2010;41:E62-E71.
- 131.** Dammaschke T, Stratmann U, Fischer RJ, Sagheri D, Schafer E. Proliferation of rat molar pulp cells after direct pulp capping with dentine adhesive and calcium hydroxide. *Clinical Oral Investigations* 2011;15:577-587.
- 132.** Dammaschke T, Stratmann U, Wolff P, Sagheri D, Schafer E. Direct Pulp Capping with Mineral Trioxide Aggregate: An Immunohistologic Comparison with Calcium Hydroxide in Rodents. *Journal of Endodontics* 2010;36:814-819.
- 133.** Dammaschke T, Wolff P, Sagheri D, Stratmann U, Schafer E. Mineral trioxide aggregate for direct pulp capping: A histologic comparison with calcium hydroxide in rat molars. *Quintessence International* 2010;41:E20-E30.

- 134.** Wu KK, Huan Y. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols in Pharmacology* 2008;40:5.47.1–5.47.14.
- 135.** Kohsaka T, Kumazawa M, Yamasaki M, Nakamura H. Periapical lesions in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Endodontics* 1996;22:418-421.
- 136.** Bucolo C, Ward KW, Mazzon E, Cuzzocrea S, Drago F. Protective Effects of a Coumarin Derivative in Diabetic Rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2009;50:3846-3852.
- 137.** Ma PP, Luo Y, Zhu XB, Ma HJ, Hu J, Tang SB. Phosphomannopentaose sulfate (PI-88) inhibits retinal leukostasis in diabetic rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009;380:402-406.
- 138.** Bostrom KI, Jumabay M, Matveyenko A, Nicholas SB, Yao YC. Activation of Vascular Bone Morphogenetic Protein Signaling in Diabetes Mellitus. *Circulation Research* 2011;108:446-457.
- 139.** Kobayashi T, Wantabe H, Morinaga K, Matsunaga K, Sekine T, Yanagisava T, et al. Changes in expression of VEGF-A, -C, and VEGFR-3 in dental pulp after tooth replantation in rats. *Journal of Hard Tissue Biology* 2012;21:57-64.
- 140.** Honore SM, Zelarayan LC, Genta SB, Sanchez SS. Neuronal loss and abnormal BMP/Smad signaling in the myenteric plexus of diabetic rats. *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical* 2011;164:51-61.
- 141.** Goldberg M, AJ S. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 2004;15:13-27.
- 142.** Muruzabal M, Erausquin J. Discussion of: methods and criteria in evaluation of periapical response. *International Dental Journal* 1970;20:539-554.

143. Cheung A, Phillips A. Bone morphogenetic proteins in orthopaedic surgery.
Current Orthopaedics 2006;20:424-429.

BIOGRAFIJA

Mr sc. dr Jugoslav Ilić rođen je 1971. godine u Kučevu. Osnovnu školu završio je u Turiji kod Kučeva, a gimnaziju u Požarevcu. Diplomirao je na Stomatološkom fakultetu u Beogradu 1996. godine sa prosečnom ocenom 8,97.

Svoj naučno-istraživački rad dr Jugoslav Ilić je započeo već u toku studija i dobijene rezultate je prikazao na više Kongresa studenata medicine i stomatologije. Za istraživanje iz oblasti oralne homeostaze nagrađen je prvom nagradom na svetskom Kongresu studenata stomatologije (IADS), 1994. god. u Kejp Taunu i Oktobarskom nagradom grada Beograda za stvaralaštvo mladih.

Dr Jugoslav Ilić je svoju kliničku karijeru započeo na Klinici za dečju i preventivnu stomatologiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu i zatim nastavio od 1999 - 2000. godine u Domu zdravlja u Golupcu i Domu zdravlja "Voždovac" u Beogradu. Na Kliniku za Bolesti zuba Stomatološkog fakulteta u Beogradu primljen je 2000.godine u zvanje asistenta pripravnika, a od 2005. je u zvanju asistenta.

Specijalistički ispit iz specijalnosti Bolesti zuba i endodoncija dr Jugoslav Ilić položio je 2003. godine, a magistarsku tezu pod naslovom "Učestalost apeksnih periodontitisa endodontski tretiranih zuba" odbranio je 2005.godine.

Dr Jugoslav Ilić učestvuje u izvođenju nastave na predmetima Bolesti zuba- pretklinika, Restaurativna odontologija, kao i Pretklinička i klinička endodoncija i Endodontologija, kao i u edukaciji doktora stomatologije na obaveznom lekarskom stažu i specijalizaciji iz oblasti Bolesti zuba i endodoncije. Mentor je u 10 studentskih radova. Član je tima Stomatološkog fakulteta u Beogradu za stomatološko zbrinjavanje osoba sa posebnim potrebama.

Mr sc. dr Jugoslav Ilić je do sada saopštio 16 naučnih i stručnih radova na domaćim i svetskim kongresima i uzeo učešće kao predavač po pozivu na tri stručna skupa. Objavio je do sada 8 radova, od čega 4 u časopisima na SCI listi. Prevodilac je i redaktor 3 poglavlja u srpskom izdanju knjige Endodontologija, autora Bergenholtz G. i saradnika, zvaničnom udžbeniku Stomatološkog fakulteta u Beogradu za redovnu i poslediplomsku nastavu iz oblasti endodoncije. Učestvovao je kao član projektnog tima u dva domaća projekta, od kojih je jedan još uvek u toku. Usavršavao se na kursevima u zemlji i inostranstvu iz oblasti endodoncije, metodologije NIR i ISO standardizacije kvaliteta. Autor je tri inovacije iz oblasti stomatologije i za njih dobitnik zlatne plakete sa likom Nikole Tesle, srebrne i bronzane medalje. Izvođač je 2 kursa iz Programa kontinuirane edukacije za doktore stomatologije i učesnik brojnih stručnih i naučnih seminara. Član je Evropskog udruženja endodontologa (ESE), Balkanskog udruženja stomatologa (BASS) i Sekcije za bolesti usta i zuba i Endodontske sekcije SLD.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Илић Југослав _____

број уписа _____ 166 _____

Изјављујем

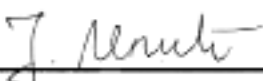
да је докторска дисертација под насловом

ZNAČAJ VASKULARNOG ENDOTELNOG FAKTORA RASTA I KOSTNOG MORFOGENETSKOG PROTEINA-2 ZA REPARATORNE SPOSOBNOSTI ZDRAVE I DIJABETESOM IZMENJENE ZUBNE PULPE

- 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, _____ 23.07.2012 _____



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Југослав Илић

Број уписа 166

Студијски програм _____

Наслов рада ZNAČAJ VASKULARNOG ENDOTELNOG FAKTORA
RASTA I KOSTNOG MORFOGENETSKOG PROTEINA-2 ZA REPARATORNE
SPOSOBNOSTI ZDRAVE I DIJABETESOM IZMENJENE ZUBNE
PULPE

Ментор Проф. др Драгица Стојић

Потписани/а Илић Југослав

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, 23.07.2012

J. Илић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

ZNAČAJ VASKULARNOG ENDOTELNOG FAKTORA RASTA I KOSTNOG MORFOGENETSKOG PROTEINA-2 ZA REPARATORNE SPOSOBNOSTI ZDRAVE I DIJABETESOM IZMENJENE ZUBNE PULPE

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, _____ 23.07.2012 _____

