



УНИВЕРЗИТЕТ У ПРИШТИНИ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Надица С. Ђорђевић

**ОЦЕНА ЕФЕКТА ЛАСЕРА МАЛЕ СНАГЕ НА
ЗАРАСТАЊЕ РАНА ЗДРАВЕ И ДИЈАБЕТЕСОМ
ИЗМЕЊЕНЕ ОРАЛНЕ СЛУЗОКОЖЕ**

докторска дисертација

Косовска Митровица, 2016

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	4
2.1. DIABETES MELLITUS.....	4
2.1.1. Епидемиолошки подаци.....	4
2.1.2. Класификација и дијагноза дијабетеса.....	5
2.1.3. Оралне манифестације дијабетеса.....	9
- Пародонтопатија.....	9
- Ксеростомија.....	11
- Орална кандидијаза.....	11
- Протезни стоматитис.....	12
- Успорено зарастање рана.....	13
- Каријес.....	13
- Синдром пекућих уста.....	14
- Орални лихен планус.....	14
2.2. ЗАРАСТАЊЕ РАНА.....	15
2.2.1. Дијабетес и зарастање рана.....	19
2.3. ЛАСЕРИ.....	21
2.3.1. Подела ласера.....	23
- Подела ласера према агрегатном стању активне супстанце.....	23
- Подела ласера према режиму рада.....	23
- Подела ласера према снази емитовања енергије.....	24
2.3.2. Механизам дејства ласера мале снаге.....	24
3. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	29
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	30
4.1. <i>IN VITRO</i> ИСПИТИВАЊЕ НА ЋЕЛИЈСКОЈ КУЛТУРИ.....	30
4.1.1. Ћелијска култура.....	30
4.1.1.1. Протокол зрачења ћелијске културе.....	32
4.1.1.2. МТТ тест ћелијске вијабилности и пролиферације.....	34

4.1.1.3. Светлосна микроскопија.....	34
4.2. <i>IN VIVO</i> ИСТРАЖИВАЊЕ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИМ ЖИВОТИЊАМА.....	35
4.2.1. Прва фаза експеримента.....	35
- Протокол за индуковање дијабетеса.....	36
4.2.2. Друга фаза експеримента.....	37
- Протокол за ласеротерапију.....	38
4.2.3. Трећа фаза експеримента.....	39
4.2.3.1. Припрема ткива за патохистолошку анализу	39
4.2.3.2. Имуноесеј за квантификацију васкуларног ендотелног фактора раста.....	42
- Узимање и припрема узорака.....	42
- Експериментални протокол за сендвич ензим имуноесеј технику-ELISA.....	42
4.2.3.3. Показатељи оксидационог стреса и антиоксидационе заштите.....	44
- Тотални Оксидациони Статус (ТОС).....	44
- Одређивање Тоталног Антиоксидационог Капацитета (ТАК).....	45
- Индекс оксидационог стреса (ОСИ).....	46
- Одређивање каталитичке активности супероксид дизмутазе (СОД).....	46
5. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА.....	48
6. РЕЗУЛТАТИ.....	49
6.1. РЕЗУЛТАТИ <i>IN VITRO</i> ИСПИТИВАЊА.....	49
6.1.1. Резултати МТТ теста.....	49
6.1.2. Резултати микроскопске анализе раста и вијабилности <i>HeLa</i> ћелија.....	51
6.1.2.1. Резултати микроскопске анализе раста и вијабилности <i>HeLa</i> ћелија након 24 h.....	51
- Зрачење кроз култивациони медијум.....	51
- Зрачење кроз дно култивационе плоче.....	56
6.1.2.2. Резултати микроскопске анализе раста и вијабилности <i>HeLa</i> ћелија након 48h.....	60
- Зрачење кроз култивациони медијум.....	60
- Зрачење кроз дно култивационе плоче.....	64
6.1.2.3. Резултати микроскопске анализе раста и вијабилности <i>HeLa</i> ћелија након 72h.....	68
- Зрачење кроз култивациони медијум.....	68
- Зрачење кроз дно култивационе плоче.....	72

6.2. РЕЗУЛТАТИ <i>IN VIVO</i> ИСТРАЖИВАЊА.....	76
6.2.1. Вредности телесне тежине код експерименталних животиња.....	76
6.2.2. Вредности гликемије код експерименталних животиња.....	81
6.2.3. Процент зарастања улцерација.....	83
6.2.4. Резултати патохистолошке анализе.....	85
6.2.4.1. Резултати патохистолошке анализе препарата животиња жртвованих трећег дана.....	85
- Патохистолошки налаз ткива животиња жртвованих трећег дана.....	92
6.2.4.2. Резултати патохистолошке анализе препарата животиња жртвованих седмог дана.....	96
- Патохистолошки налаз ткива животиња жртвованих седмог дана.....	104
6.2.4.3. Резултати патохистолошке анализе препарата животиња жртвованих десетог дана.....	108
- Патохистолошки налаз ткива животиња жртвованих десетог дана.....	112
6.2.5. Вредности VEGF у ткиву.....	116
6.2.6. Вредности показатеља оксидационог стреса и антиоксидационе заштите.....	118
7. ДИСКУСИЈА.....	130
7.1. ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА <i>IN VITRO</i> ИСПИТИВАЊА.....	130
7.2. ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА <i>IN VIVO</i> ИСТРАЖИВАЊА.....	133
8. ЗАКЉУЧЦИ.....	157
9. ЛИТЕРАТУРА.....	160

1. УВОД

Стоматогнатни, мастикаторни, орофацијални систем или орган за жвакање, синоними су за систем кога сачињавају: коштане структуре обе вилице, неуромишићне и неуроваскуларне структуре, темпоромандибуларни зглобови, плувачне жлезде, лимфни судови и оклузални комплекс са потпорним апаратом [1].

Ткива и органи који га чине су морфолошки и функционално различити, али имају јединствену, вишеструку улогу у извођењу физиолошких функција жвакања, гутања, варења, дисања и говора. Уобичајено функционисање одвија се захваљујући повратној неуромускуларној контроли [2]. Стоматогнатни систем је веома адаптабилан и одупире се различитим утицајима који могу да наруше хармоничан однос његових компоненти. Међутим, уколико утицај штетних фактора пређе праг толеранције, настају бројна оштећења.

Најчешће оралне болести су каријес и обољења пародонта. Услед неадекватног лечења може доћи до губитка појединих или свих природних зуба, што доводи до поремећаја у функционисању стоматогнатног система. Поред поремећене функције, код ових пацијената нарушава се изглед и облик лица. Пацијенти добијају старачки изглед са појавом бора на лицу и око усана. У циљу рестаурације и рехабилитације функција стоматогнатног система, намеће се потреба да се, између осталог, у одређеним ситуацијама приступи изради мобилних зубних надокнада.

Пацијенти код којих постоји потреба за неком врстом зубне надокнаде морају бити припремљени како би се постигла успешна рехабилитација нарушених функција [3]. Усна дупља је прекривена слузокожом (*tunica mucosa*) и у току своје функције изложена је деловању различитих штетних фактора, који могу бити локалне или опште природе. Овим факторима супростављају се заштитни механизми и на тај начин организам успева да одржи баланс, тако да анатомски и функционални интегритет ткива буду очувани. У тренутку када заштитни механизми више не могу да се супротставе деловању штетних агенаса, настају патолошке промене на оралној слузокожи, као самостална обољења или у склопу неког системског обољења [4-6].

Пре почетка протетске рехабилитације, кост и мека ткива уста морају бити здрави, а све евентуалне промене на оралној слузокожи морају бити саниране и доведене у здраво стање. Терапија промена оралне слузокоже зависи од узрока и од типа настале промене [3]. Највећи број пацијената код којих се израђују неке врсте зубних надокнада припадају старијој популацији, и из тог разлога на ткивима у усној шупљини треба разликовати промене настале као последице старења од патолошких промена насталих у склопу неког општег обољења или обољења у самој усној дупљи. Сам процес старења, као и болести које се јављају у старијој животној доби, лекови који се користе у лечењу тих болести, могу изазвати промене у усној шупљини [3]. Понекад се патолошке промене појединих органских система прво манифестују у усној дупљи и упозоравају да нешто није у реду са здрављем. Бројна хронична обољења, као што је дијабетес, затим неуролошка, реуматска, малигна обољења и друга, могу изазвати појаву различитих промена и симптома у усној дупљи. Такве промене могу да варирају од поремећене способности обнављања оралне слузокоже, па до великих оштећења. Поред тога могу утицати на секрецију пљувачке и тако доводе до ксеростомије, што може да води ка појачаној склоности ка инфекцијама, трауми оралне слузокоже, појави каријеса.

Дијабетес је стање хроничне хипергликемије које настаје под заједничким деловањем пре свега генетских фактора, фактора спољашње средине и начина живота. Настаје услед апсолутног или релативног недостатка инсулина, што доводи до поремећаја у метаболизму масти, угљених хидрата и протеина [7, 8]. У току дијабетеса у усној дупљи се јављају промене на свим оралним ткивима, са различитим симптомима и знацима. Јављају се промене на крвним судовима, смањује се секреција пљувачке, долази до појаве инфламације гингиве, ресорпције алвеоларне кости, повећане акумулације денталног плака, може се јавити црвенило и оток језика са атрофијом језичних папила, кандидијаза, печење и жарење [9, 10]. Као последица промена на оралним ткивима у току дијабетеса, повећава се могућност настанка ерозија и улцерација оралне слузокоже на местима где је у контакту са базом зубне протезе [11].

Због тежине самог обољења, као и компликација које се могу јавити уз појаву промена на оралним ткивима, пацијенти са дијабетесом захтевају посебан третман и приступ приликом израде зубних надокнада. У току израде мобилних зубних надокнада

морају се испунити одређени захтеви како би се омогућило нормално обављање функција свих структура стоматогнатног система. Уколико су мобилне зубне надокнаде неадекватне, могу да доведу до немогућности нормалног функционисања и појаве лезија на оралним ткивима које ограничавају или онемогућавају њихово коришћење [12].

Велика учесталост патолошких промена на неким ткивима усне дупље код пацијената са дијабетесом, уз појаву значајних субјективних симптома, као и сазнање да мобилне зубне надокнаде представљају један од могућих узрочника тих промена, оправдавају изналажење ефикасних терапијских поступака за санирање ових стања. Један од тих поступака јесте и примена ласера мале снаге.

Ласери мале снаге стимулишу зарастање рана, утичу на смањено стварање фиброзног ткива и ожиљака, умањење постоперативног бола, едема и тризмуса, а користе се и у терапији пародонтопатије и обољења меких ткива усне дупље. Посебно је од значаја чињеница да је примена ласера мале снаге потпуно безболна, неинвазивна и без штетних ефеката.

Данас се зна да зрачење ласера мале снаге може имати примарне (фотохемијски, фотоелектрични и фотоенергетски) и секундарне ефекте (стимулација ћелијског метаболизма и микроциркулације). Из њих произилазе терапијски ефекти ласера: аналгетски, антиинфламаторни, антиедематозни и биостимулативни [13].

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. DIABETES MELLITUS

Светска здравствена организација (СЗО) дефинише *diabetes mellitus* (дијабетес мелитус-ДМ, дијабетес, шећерна болест) као хроничну болест, која се јавља када панкреас не производи довољно инсулина, или када тело не може ефикасно да користи створени инсулин. У тим условима смањено је преузимање глукозе од стране периферних ткива уз истовремено ослобађање из јетре. То доводи до повећања концентрације глукозе у крви (хипергликемија), док ћелије трпе њен недостатак [14]. Хипергликемија која превазилази бубрежни праг реапсорпције глукозе доводи до гликозурије. Услед ефекта осмотске диурезе, урином се губе велике количине воде заједно са глукозом што доводи до појаве полиурије.

Поред поремећаја у метаболизму глукозе, поремећен је и метаболизам липида и протеина. Повећава се катаболизам липида, а смањује синтеза масних киселина и триацилглицерола. Повећана разградња триацилглицерола и ослобођених масних киселина доводи до нагомилавања ацетил коензима А (acetil Ко-А), чији се вишак преводи у кетонска тела. Настаје поремећај у метаболизму холестерола који се карактерише или повећаном синтезом у јетри или смањеним уклањањем из циркулације. Расте концентрација VLDL и LDL холестерола у плазми и убрзава се процес атеросклерозе. Уз хроничну хипергликемију могу настати бројне патолошке промене на разним органима. У току болести се прогресивно развијају васкуларне (артериосклероза, микроангиопатија), неуролошке (ононеуропатија, полинеуропатија, амиотрофија, аутономна неуропатија), очне (ретинопатија, слепило), реналне (нефропатија, уремија, лезије бубрега) и друге компликације [7, 8].

2.1.1. Епидемиолошки подаци

Дијабетес као једно од најчешћих незаразних хроничних обољења, како у нашој земљи, тако и у свету, има тенденцију сталног раста. По подацима Светске здравствене

организације и Међународне федерације за дијабетес за 2014-у годину, у свету од дијабетеса болује преко 387 милиона људи. Број оболелих у свету је до 2010-е године био око 285 милиона, а процењује се да ће до 2035-е године број оболелих порасти на 592 милиона [8, 15]. Према истим изворима у Србији, без података за Косово и Метохију, је у 2010-ој години број оболелих од дијабетеса био приближно 600,000 или 8.2% популације [8]. Према подацима Института за јавно здравље “Др Милан Јовановић-Батут“ за 2014-у годину, стопа оболелих у Србији је око 710,000, односно 12.4% становништва [16].

Претпоставља се да на сваког регистрованог болесника долази још један нерегистровани случај. Тип 2 дијабетеса је најзаступљенији од свих типова дијабетеса. Сматра се да је у односу на тип 1 дијабетеса, тип 2 заступљен у 95% случајева [8]. Дијагноза обољења најчешће се поставља код особа између 65-е и 69-е године живота, када су већ наступиле кардиоваскуларне компликације. Данас се у свету, посебно у земљама у развоју, региструје све већи број оболелих од дијабетеса типа 2 у дечијем узрасту и код адолесцената, што се повезује са начином исхране и појавом гојазности. Због свега наведеног, дијабетес представља једну од најзначајних болести данашњице. Генерална скупштина Уједињених нација донела је посебну резолуцију о дијабетесу, где се ово обољење третира као глобални проблем, и прогласила 14. новембар светским даном борбе против дијабетеса.

2.1.2. Класификација и дијагноза дијабетеса

Дијабетес етиолошки и клинички представља хетерогену групу поремећаја које у основи имају хипергликемију [17].

Светска здравствена организација дала је класификацију дијабетеса на четири клиничке категорије. Етиолошка класификација извршена је на основу патогенетских механизма настанка дијабетеса (табела 1) [7, 14].

Табела 1. Етиолошка класификација дијабетеса [7]

<p>I. Тип 1 дијабетеса (деструкција бета ћелија која води потпуном недостатку инсулинске секреције)</p> <p>А. Посредован имунолошким процесом</p> <p>Б. Идиопатски</p> <p>II. Тип 2 дијабетеса (може се рангирати од инсулинске резистенције до доминантног дефицита секреције инсулина који је удружен са инсулинском резистенцијом)</p> <p>III. Други специфични типови дијабетеса</p> <p>А. Генетски дефицити функције β ћелија услед мутације на гену</p> <p>Б. Генетски условљени дефект у дејству инсулина</p> <p>В. Дијабетес услед болести егзокриног панкреаса</p> <p>Г. Дијабетес у оквиру ендокриних болести</p> <p>Д. Дијабетес индукован лековима или хемикалијама</p> <p>Ђ. Дијабетес индукован инфекцијама</p> <p>Е. Ретки облици имунолошки посредованог дијабетеса</p> <p>Ж. Друге наследне болести код којих се може јавити дијабетес</p> <p>IV. Гестациски дијабетес</p>
--

Два основна типа дијабетеса су Тип 1 и Тип 2 дијабетеса, и они се доста разликују један од другог у погледу етиологије и епидемиологије.

Тип 1 дијабетеса се јавља у око 5-10% особа са дијабетесом. Овај тип дијабетеса се обично јавља у детињству или пубертету, односно код особа млађих од 40 година. Обољење се развија као последица синергистичког деловања генетских фактора, фактора спољашње средине и имунолошких фактора који доводе до деструкције β -ћелија панкреаса. Сматра се да код особа оболелих од овог типа дијабетеса постоје аутоантитела на ћелије које луче инсулин и да се она могу детектовати 10-15 година пре почетка обољења. Болест углавном почиње нагло и у тренутку када се дијагноза болести постави већ је уништено преко 70% β -ћелија панкреаса. Код скоро половине особа које су оболеле од дијабетеса типа 1, карактеристичан је налаз дијабетогених ХЛА антигена (engl. *Human Leukocyte Antigen*) [18]. Сматра се да особе које поседују ХЛА-ДР 3 и ХЛА-ДР 4 антиген,

имају већи ризик да оболе од овог типа дијабетеса. Фактори средине играју значајну улогу у етиологији дијабетеса типа 1 и они имају утицај како на почетак болести, тако и на њен развој. Бројни вируси, токсичне материје, као и неки фактори укључени у свакодневну исхрану, могу да доведу до оштећења панкреаса и да покрену аутоимуноу реакцију. Код деце и адолесцената у највећем броју случајева, кетоацидоза је прва манифестација обољења. Код одраслих особа већином је очувана резидуална функција β -ћелија довољна да спречи појаву кетоацидозе дуги низ година. Јављају се сви симптоми болести (полифагија, полидипсија, полиурија, предиспозиција за инфекције и анорексија) који у случајевима наглог почетка болести брзо прогредирају [17].

Тип 2 дијабетеса је заступљен код 90-95% оболелих од дијабетеса. Углавном се јавља код особа старијих од 40 година. То је такође мултифакторијално обољење код кога се у етиологији кључна улога приписује генетским и факторима спољашње средине. Овај тип дијабетеса карактеришу инсулинска резистенција, абнормална секреција инсулина и повећана хепатичка продукција глукозе. Особе оболеле од дијабетеса типа 2 углавном немају потребу за инсулинском терапијом и болест се контролише дијетом или оралним антидијабетикима. Већина болесника је гојазна, а преваленца гојазности варира међу различитим расама, континентима, културама, степену економског развоја итд. Висок степен учесталости обољења је код Пима индијанаца, код којих је скоро половина популације оболела, а најнижа стопа оболелих је у руралним подручјима Африке [17]. Појава дијабетеса типа 2 је удружена са прекомерном телесном тежином, абдоминалним типом гојазности и физичком неактивношћу. До скоро се сматрало да се овај тип дијабетеса јавља само код одраслих особа, али данас је присутан и код деце и адолесцената у целом свету [19]. Кетоацидоза се ретко спонтано јавља и обично је повезана са стресом или неком другом болешћу. Јављају се сви симптоми болести, али су слабијег интензитета с обзиром да се овај тип дијабетеса постепено развија. Више од 80% оболелих је гојазно и код њих се болест најчешће открива приликом рутинских анализа [20].

Под називом “други специфични облици дијабетеса” подразумевају се типови дијабетеса који се због својих карактеристика не могу сврстати у неку другу категорију. Овде спада пре свега дијабетес који настаје као последица генетског дефицита функције β

ћелија, затим услед генетски условљеног дефекта у дејству инсулина, дијабетес услед болести егзокриног панкреаса, дијабетес индукован лековима или хемикалијама, дијабетес индукован инфекцијама, имунолошки посредован дијабетес као и дијабетес у склопу неке наследне болести [7].

Гестацијски дијабетес представља поремећај у толеранцији глукозе који се јавља у току трудноће, али нестаје неколико недеља након порођаја. У току гестацијског дијабетеса постоји ризик и за мајку и за дете. Код трудница се могу развити различите компликације, као што су прееклампсија, хипергликемијска криза и друге, док се код плода могу јавити хиперинсулинемија и повећани раст плода, што може довести до компликација у току порођаја. Сматра се да је учесталост гестацијског дијабетеса код трудница приближно 7% [18].

Уобичајене методе дијагнозе дијабетеса су базиране на различитим тестовима урина и крви. Дијагностички критеријум СЗО за постављање дијагнозе дијабетеса огледа се у гликемији наше која је ≥ 7.0 mmol/l (126mg/dl) или плазма глукозе у 120 min након оралног теста оптерећења глюкозом, ОГТТ-а ≥ 11.1 mmol/l (200 mg/dl) (табела 2) [7].

Табела 2. Дијагностички критеријуми СЗО за дијабетес и стање хипергликемије [7]

<i>Дијабетес</i>	
Гликемија наше или плазма глукоза у 120 мин. ОГТТ-а*	≥ 7.0 mmol/l (126mg/dl) ≥ 11.1 mmol/l (200mg/dl)
<i>Интолеранција на глюкозу (IGT; impaired glucose tolerance)</i>	
Гликемија наше и плазма глукоза у 120 мин. ОГТТ-а*	< 7.0 mmol/l (126mg/dl) ≥ 7.8 mmol/l и < 11.1 mmol/l (140mg/dl и 200mg/dl)
<i>Оштећена гликемија наше (IFG; impaired fasting glucose)</i>	
Гликемија наше у плазми и (ако је одређено) плазма глукоза у 120 мин. ОГТТ-а*	6.1 до 6.9 mmol/l (110mg/dl-124mg/dl) < 7.8 mmol/l (140mg/dl)

*ако плазма глукоза у 120 min није одређена, стање може указивати и на дијабетес и на IGT

Америчка асоцијација за дијабетес (ADA), Европска асоцијација за студије у дијабетесу (EASD) и Међународна дијабетесна федерација (IDF), издали су консензус препорука за дијагнозу дијабетеса и уврстили су гликозирани хемоглобин (HbA1c) као критеријум за постављање дијагнозе дијабетеса. Гликозирани хемоглобин одражава просечну вредност гликемије у плазми током претходна 2-3 месеца у једном мерењу, које може бити спроведено било када у току дана и не захтева посебне припреме, укључујући и стање гладовања. Дијагнозу дијабетеса треба поставити када је $HbA1c \geq 6.5\%$ и потврдити је понављањем налаза HbA1c. Уколико није могуће урадити одређивање HbA1c за постављање дијагнозе, потребно је користити раније препоручене дијагностичке тестове (нпр. гликемију наше, гликемију у 120 min ОГТТ-а) [7].

2.1.3. Оралне манифестације дијабетеса

Постоји веома широк спектар клиничких промена и субјективних симптома којима се дијабетес манифестује у усној дупљи. Код оболелих се најчешће запажа већа преваленца пародонтопатије, синдрома пекућих уста и каријеса, поремећај у протоку пљувачке и опортунистичке инфекције [21, 22]. Повећана склоност ка инфекцијама у усној шупљини повезује се са смањеном секрецијом пљувачке, смањеним пуферским капацитетом пљувачке и лошом оралном хигијеном [23]. Код ових пацијената описује се и већа преваленца протезног стоматитиса, оралног лихен плануса, фисурног језика, *cheilitis angularis-a* итд. [24]. Хронична хипергликемија код дијабетеса доводи до структурних промена у ткивима и до поремећаја у зарастању рана, микро и макро васкуларних поремећаја [25, 26]. Оралне промене код пацијената са дијабетесом праћене су симптомима који по карактеру варирају од благих до веома тешких.

❖ Пародонтопатија

Пародонтопатија је хронично обољење пародонцијума за чији настанак најзначајнију улогу имају микроорганизми денталног плака. На настанак и развој обољења поред локалних фактора утиче и опште стање организма. Фактори ризика за

настанак пародонтопатије су и системска обољења, као што су болести крви, дијабетес и друга. Ове болести могу деловати као фаворизујући фактор, при чему мењају или слабе отпорност оралних ткива и пародонцијума на локалне иритације [27]. Патолошке промене у току пародонтопатије доводе до деструктивних промена пародонцијума, које воде до његове анатомске и функционалне дезинтеграције, а што за последицу има расклађење и касније губитак једног или више зуба. Пародонтопатија је пре скоро две деценије уврштена као шеста компликација дијабетеса [28]. Америчка асоцијација за дијабетес (ADA) наводи да се хипертензија, поремећај у метаболизму масти и пародонтопатија често срећу код особа оболелих од дијабетеса [29].

Дијабетес узрокује повећану концентрацију глукозе у пљувачци и гингивалној течности, што доприноси већој пролиферацији бактерија и оралном запаљењу. Код пацијената са неконтролисаним гликемијом запажа се чешћа појава гингивитиса и пародонтопатије праћених губитком алвеоларне кости [30]. Деструкција пародонталног ткива је повећана услед микроангиопатије, поремећаја метаболизма колагена, поремећаја имунолошког одговора макрофага на антигене денталног плака и поремећеног хемотаксичног одговора неутрофила [31, 32]. У центру патогенетских збивања током пародонталне деструкције код особа са лоше контролисаним дијабетесом лежи повећање нивоа крајњих производа гликације- AGEs (engl. *Advanced glycation end-products*) у плазми и ткивима пацијената, који покрећу локални инфламаторни одговор ткива пародонцијума. У ткивима усне дупље они се путем полипептидних рецептора везују на површини циљних ћелија, макрофага, доводећи до повећане продукције проинфламаторних цитокина (IL-1 β , TNF- α), простагландина E2 и матрикс металопротеиназе, који се сматрају кључним факторима деструкције везивног ткива и алвеоларне кости у току пародонтопатије [32-37].

У гингиви и пародонцијуму дијабетичара запажају се интензивне инфламаторне промене, праћене обимним разарањем пародонталних ткива са појавом дубоких пародонталних цепова [31, 34, 37]. Гингива код оболелих је изразито црвена, едематозна и крвари на најмању провокацију. Често се стварају пародонтални апсцеси и болест се развија веома брзо, тако да болесници за кратко време остају без зуба [38]. Варијација у тежини обољења пародонцијума уско је повезана са степеном метаболичке контроле и

дужином трајања болести [37]. У прилог овим чињеницама иду и резултати истраживања које су спровели Цицмил и сарадници [39], где је показано да су код болесника са добро контролисаним обољењем и добром оралном хигијеном вредности испитиваних пародонталних параметара, плак-индекса (ПИ) по Silness-Löe-у, индекса крварења гингиве (ИКГ), дубине пародонталног џепа (ДПЦ) и нивоа припојног епитела (НПЕ), ниже него код болесника са лоше контролисаним дијабетесом и лошијом оралном хигијеном.

❖ Ксеростомија

Ксеростомија (сувоћа уста) настаје услед смањеног лучења пљувачке (хипосаливације) или њеног потпуног недостатка. Представља један од иницијалних симптома дијабетеса на оралној слузокожи. Хипосаливација код дијабетеса може бити узрокована полиуријом која доводи до смањења запремине екстрацелуларне течности. Поред тога, дијабетес је један од узрока настанка сијалозе, која се манифестује ксеростомијом [40]. Carda и сарадници [41] су показали да је тип 2 дијабетеса фактор ризика за појаву ксеростомије. Дијабетес изазива структурне промене у пљувачним жлездама у виду атрофије ацинуса и нагомилавања липидних капи у цитоплазми. Ксеростомија може довести до поремећаја укуса, отежаног гутања, говора и проблема у току ношења зубних надокнада. Мооге и сарадници [42] су истраживали учесталост ксеростомије, хипосаливације и могућу повезаност између поремећаја у лучењу пљувачке и дијабетичних компликација код пацијената оболелих од дијабетеса типа 1. С обзиром да се саливација одвија под утицајем аутономног нервног система, резултати њиховог истраживања су показали да ксеростомију и смањену секрецију пљувачке знатно чешће имају пацијенти код којих се развила неуропатија као компликација дијабетеса. Као последица ксеростомије јавља се сува, атрофична орална слузница, коју могу да прате мукозитис, улцерације, опортунистичке бактеријске, вирусне и гљивичне инфекције [43].

❖ Орална кандидијаза

Орална кандидијаза је честа опортунистичка инфекција код дијабетесних болесника [44]. *Candida albicans* је гљивица која чини део нормалне флоре усне дупље и

не доводи до клиничких манифестација све док постоји биолошка равнотежа. Дијабетес ремети ту оралну хомеостазу и доводи до дисбаланса оралне флоре са последичним повећањем броја и патогених облика *Candida albicans*, поготову у случају лоше гликорегулације и чешће код пацијената који пуше и/или носе зубне протезе [45-47]. Сматра се да у основи учестале појаве кандидијазе код дијабетесних болесника лежи поремећај у функцији полиморфонуклеара (ПМН), који имају огроман утицај у заштити ткива од инфекције и представљају прву линију одбране. Код оболелих од дијабетеса неутрофили показују значајно смањење хемотаксе, фагоцитозе и адхеренције [48]. Већој учесталости оралне кандидијазе код пацијената са дијабетесом, поред осталих локалних и системских предиспонирајућих фактора, доприноси и поремећај у лучењу пљувачке [49]. Орална кандидијаза се најчешће локализује на језику и угловима усана, а код пацијената са зубним протезама на тврдом непу испод протезне базе.

❖ Протезни стоматитис

Протезни стоматитис је инфламаторни процес који углавном захвата слузокожу непца и алвеоларног гребена која је у контакту са мобилном зубном надокнадом. Етиологија је мултифакторијална и најчешће се доводи у везу са гљивицама из рода *Candida* [50, 51]. Један од општих фактора ризика значајан за настанак протезног стоматитиса јесте дијабетес. Истраживања су показала да је код носилаца мобилних зубних надокнада са дијабетесом већа учесталост колонизације протезе *Candidom albicans*, а самим тим и повећан ризик за настанак протезног стоматитиса [47, 51]. Сматра се да је код ових пацијената услед трауматског дејства протезе смањена отпорност ткива на инфекције због повећане пропустљивости епитела за растворљиве антигене и токсине гљива из рода *Candida* [46]. Присуство ових штетних продуката доводи до уништавања пљувачних имуноглобулина и инфламаторног одговора ткива [52]. Јавља се еритем испод протезе који може да варира од циркумскриптног до дифузног. Слузокожа је сува и самим тим подложнија за настанак ерозија, улцерација и трауматских улкуса. Присутни су симптоми жарења и печења, а у неким случајевима и *foetor ex ore* [53].

❖ Успорено зарастање рана

Бројни локални и општи фактори могу да утичу на процес зарастања рана. Локалним факторима сматрају се инфекција, присуство страног тела у рани и недовољно снабдевање кисеоником. Општи фактори који утичу на зарастање могу бити стрес, старење, поремећај циркулације, конзумирање алкохола, пушење, уремија, одређени лекови и многе системске болести, као што је дијабетес итд. [54].

Дијабетес је обољење код кога се јавља поремећај у васкуларизацији. Смањење васкуларизације изазива хипоксију и поремећај у зарастању рана. Хипоксија доводи до појачаног инфламаторног одговора ткива и стварања слободних радикала који проузрокују отежано зарастање рана. Главни извор слободних радикала су ензими NADPH оксидаза и ксантин оксидаза [55]. Повећање нивоа глукозе у крви и нивоа крајњих производа гликације (AGEs) доводе до поремећаја у зарастању рана [56]. Поједини аутори [57] су се у својим истраживањима бавили поремећајем циркулације код дијабетесних болесника и проценом значаја васкуларног ендотелног фактора раста (VEGF, engl. *vascular endothelial growth factor*) у зарастању рана, с обзиром да се он сматра примарним проангиогенским фактором у ранама. Нормалан ток зарастања рана карактерише стварање гранулационог ткива, односно фиброваскуларног ткива које садржи фибробласте, колаген и крвне судове. Васкуларни ендотелни фактор раста се у ткиву јавља веома брзо након настанка рана. Новостворени крвни судови омогућавају бољу снабдевеност ткива крвљу и хранљивим материјама. Поремећај у стварању VEGF код оболелих од дијабетеса доводи до отежаног зарастања рана [57, 58].

❖ Каријес

Каријес и пародонтопатија спадају у најчешћа обољења човека и имају велики здравствени, социјални и економски значај. Према извештају Светске здравствене организације каријес и даље представља светски здравствени проблем у многим развијеним земљама [59]. Каријес настаје као последица међусобног деловања већег броја узрочника. Код пацијената са дијабетесом запажена је већа учесталост каријеса. Miralles и

сарадници [60] су у свом истраживању показали већу учесталост каријеса код пацијената оболелих од дијабетеса типа 1, али нису успели да утврде повезаност веће инциденце каријеса са метаболичком контролом, дужином трајања болести као и појавом каснијих компликација дијабетеса. Са друге стране, Jawed и сарадници [61] су у свом истраживању утврдили да је повећана учесталост каријеса повезана са смањеним протоком пљувачке, лошом гликорегулацијом и повећаним вредностима гликозираног хемоглобина (HbA1c).

❖ Синдром пекућих уста

Синдром пекућих уста је чест симптом код пацијената оболелих од дијабетеса. У литератури и клиничкој пракси за ова стања се користе различити синоними, као што су стоматопирозе, стоматодиније, глосодиније итд. [62]. Пацијенти се жале на осећај печења и жарења у устима, а у одсуству клинички видљивих алтерација оралне слузокоже [62, 63]. Различити локални, системски и психолошки фактори су удружени са овим синдромом [64]. Локални фактори су: смањена ретенција зубне протезе, денталне аномалије, алергијске реакције, инфекција и ксеростомија. Системски фактори су: хипотиреоидизам, дијабетес и анемије. Психолошки фактори су: депресија и анксиозност. Мооге и сарадници [65] су у свом истраживању показали већу учесталост синдрома пекућих уста код жена оболелих од дијабетеса типа 1 код којих се развила периферна неуропатија као компликација обољења. Сличне резултате су приказали и Ship и сарадници [66]. Међутим, његова етиологија је још увек нејасна, што ствара потешкоће око лечења и праћења оваквих болесника [67-69].

❖ Орални лихен планус

Lichen planus је хронично мукокутано инфламаторно обољење непознате етиологије, које осим коже често напада и слузокожу усне дупље. Орални лихен карактеришу беле папуле, дискретне или у облику различитих формација. Орални лихен планус (ОЛП) се може развити на било ком делу оралне слузокоже. Најчешће се појављује симетрично обострано на слузокожи образа, и то у пределу оклузалне линије и у ретро моларном региону, затим на језику, гингиви, док су остале локализације знатно ређе [70,

71]. Grinspan [72] је у свом истраживању указао на повезаност између ОЛП, дијабетеса и хипертензије, а тај тријас симптома је означен као Гринспан-ов синдром. Међутим, досадашња истраживања нису потврдила повезаност између ОЛП и дијабетеса. Сматра се да су лихеноидне реакције на оралној слузокожи код пацијената са нерегулисаним гликемијом последица одговора на антидијабетесну и антихипертензивну терапију [73].

2.2. ЗАРАСТАЊЕ РАНА

Слузокожа усне дупље је прекривена плочасто-слојевитим епителом испод кога се налази везивно ткиво кога чине фибробласти, колаген и крвни судови. Дебљина оралне слузокоже варира у зависности од локализације у усној дупљи, односно степена кератинизације. Испод слузокоже у пределу усана, образа и неких делова тврдог и меког непца налази се субмукоза у којој се налази масно или жлездано ткиво са крвним судовима и нервима. У пределу гингиве и делимично тврдог непца нема субмукозе, већ је слузокожа директно везана за периост.

У случају губитка већег броја или свих природних зуба, а у циљу рехабилитација функција стоматогнатног система, израђују се мобилне зубне надокнаде. Ткива и слузокожа усне дупље у том случају морају да прихвате и дистрибуирају нефизиолошке силе [3]. Код трећине пацијената са мобилним зубним надокнадама јављају се објективне и субјективне сметње као последице механичког, хемијског, термичког или токсичног утицаја протезе или алергијске реакције. У односу на врсту мобилне зубне надокнаде, оралне промене се чешће јављају код особа које носе тоталне протезе у односу на особе са парцијалним протезама [74, 75]. Ово се може објаснити и чињеницом да тоталне протезе покривају знатно већу површину оралне слузокоже у односу на парцијалне [76].

Најчешћи етиолошки фактори који доводе до оштећења оралне слузокоже су: неадекватни рубови протеза (оштри, недовољно екстендирани или преекстендирани), неприпремљеност носећих ткива за прихватање зубне надокнаде, недовољна ретенција и стабилизација, као и неслагање микро и макрорелефа носећих ткива и протезе [77].

Неадекватне мобилне зубне надокнаде могу да доведу до настанка акутних или хроничних промена испод протезне плоче [76, 78]. Промене настају када деловање штетних фактора превазилази отпорност ткива на које делују. Најчешће промене које настају код ових пацијената су трауматске повреде, протезни стоматитис и *cheilitis angularis* [75].

Код рана настаје прекид континуитета слузокоже, при чему могу бити делимично или потпуно захваћени и дубљи слојеви. Акутне промене настају након предаје мобилних зубних надокнада, односно у периоду прилагођавања, и оне могу бити последица не само конструктивних карактеристика зубних надокнада, већ и индивидуалне остелјивости ткива и оклузо-артикулационих односа [79]. У тим ситуацијама најважније је што пре уклонити узрок оштећења, јер у супротном промена поприма хронични карактер и долази до пролиферативних промена, односно хиперплазије слузокожног епитела. Уклањањем етиолошког фактора и применом одговарајућих антисептичких и дезифицијентних средстава промене релативно брзо зарастају [79]. Међутим, код пацијената који болују од дијабетеса зарастање рана може бити отежано.

Ране на оралној слузокожи зарастају на сличан начин као и ране на кожи, пролазе кроз исте фазе, али ипак постоји разлика у брзини зарастања, као и у томе да ране на оралној слузокожи зарастају без или са минималним стварањем ожиљака [80]. Код ових рана испољава се мања инфламација него код рана на кожи, са мањом инфилтрацијом неутрофила, макрофага и Т-ћелија. Поред тога код оралних рана смањена је продукција цитокина, укључујући производњу интерлеукина 6 (IL-6), трансформишућег фактора раста $\beta 1$ (TGF $\beta 1$, engl. *transforming growth factor beta 1*) и хемокина којег продукују кератиноцити (КС, engl. *keratinocyte-derived chemokine*) [80].

Контакт са пљувачком која садржи цитокине и факторе раста, као што је епидермални фактор раста, трансформишући фактор раста и инсулину сличан фактор раста, утиче на брже зарастање рана у усној дупљи [81, 82]. Последице, у случају недостатака пљувачке долази до успореног зарастања рана [83].

Зарастање рана је сложен физиолошки процес који обухвата широк спектар ћелијских реакција и биолошког одговора организма, што као крајњи резултат има очување функције. Овај процес пролази кроз неколико фаза и укључује хемостазу,

инфламаторну реакцију, диференцијацију, пролиферацију, ангиогенезу, реепителизацију и ремоделацију оштећеног ткива.

Прва фаза, хемостаза, наступа одмах након настанка ране и карактерише се вазоконстрикцијом крвних судова и агрегацијом тромбоцита [84]. Вазоконстрикцијом крвних судова зауставља се крварење и спречава даљи губитак крви, чиме се омогућава даља перфузија ткива и локално стимулише процес зарастања. Тромбоцити су крвне ћелије без једра и формирају се у коштаном сржи из мегакариоцита. Агрегацијом тромбоцита ствара се крвни угрушак и активирају разни фактори из плазме и ткива. Ензим тромбопластин активира протромбин и претвара га у тромбин, који затим течни фибриноген претвара у фибрин [85].

Из крвног угрушка и околног ткива ране ослобађају се бројни проинфламаторни цитокини и фактори раста. Фактори раста су биолошки медијатори мултифункционалних особина који регулишу ћелијске процесе у току зарастања ране, убрзавају и модификују овај процес. Они привлаче ћелије у рану, делују стимулативно на њихову пролиферацију и учествују у депозицији екстрацелуларног матрикса [86].

Активацијом тромбоцита из гранула се ослобађају и инхибитори (ендостатин, макроглобулин, ангиостатин и други) и промотери ангиогенезе (васкуларни ендотелни фактор раста, тромбоцитни фактор раста, базни фибробластни фактор раста и други) [87]. Ослобођени цитокини, као што су тромбоцитни фактор раста PDGF (engl. *platelet-derived growth factor*) и TGF β 1, делују хемотактично и стимулишуће на ћелије које учествују у процесу зарастања рана [88].

Друга фаза, инфламаторна, карактерише се доминантним умножавањем неутрофила, макрофага и лимфоцита [89, 90]. Након оштећења ткива ослобођени хемијски медијатори изазивају акутно запаљење на ивицама ране, које је праћено појавом и миграцијом неутрофила. Неутрофили се у року од неколико минута појављују на месту повреде и њихов број се повећава у наредних неколико дана. Главна функција неутрофила је да уништавају микроорганизме и спрече настанак инфекције [88]. Неутрофили процесом фагоцитозе из ране отклањају бактерије, стране материје и оштећене ћелије [91]. Они ослобађају разне медијаторе и факторе раста, као што су интерлеукин 8 (IL-8) и VEGF, који подстичу реваскуларизацију и зарастање рана.

Истраживања спроведена на здравим и мишевима оболелим од дијабетеса показала су да се смањењем броја неутрофила убрзава процес зарастања рана [92]. Неутрофили се из ране уклањају путем апоптозе, за шта су одговорни макрофаги [91].

Макрофаги се, поред неутрофила, појављују брзо на месту повреде, и њихов број се повећава како циркулишући моноцити прелазе у екстраваскуларни простор и диферентују у зреле ткивне макрофаге [85]. Макрофаги производе низ проинфламаторних цитокина. Сматра се да су они најзаслужнији за успешно зарастање рана јер стимулишу процес ослобађајући факторе раста као што су трансформишући фактор раста-алфа TGF- α (engl. *transforming growth factor α*), TGF- β , PDGF и друге [88]. Поред тога, макрофаги у ранама стимулишу реепителизацију и ангиогенезу секретујући факторе раста као што су VEGF и фибробластни фактор раста FGF (engl. *fibroblast growth factor*) [88].

Васкуларни ендотелни фактор раста, поред макрофага, производе и други различити типови ћелија који учествују у процесу зарастања рана: ендотелне ћелије, фибробласти, глатко-мишићне ћелије, тромбоцити и неутрофили [93]. Васкуларни ендотелни фактор раста припада фамилији која обухвата VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E и плацентални фактор раста. Они испољавају своје биолошке функције везивањем за три различита рецептора означена као VEGFR-1, VEGFR-2, и VEGFR-3 [94]. Најважнији од тих рецептора за ангиогенезу је VEGFR-2, који се налази на ендотелним ћелијама. VEGF стимулише пролиферацију и покретљивост ендотелних ћелија [94]. Протеолитички ензими разарају базалну мембрану крвних судова омогућавајући миграцију и пролиферацију ендотелних ћелија из околине ране и формирање нових крвних судова [95].

Главни стимулатор продукције VEGF-а и ангиогенезе у току процеса зарастања рана је хипоксија. Како расту метаболичке потребе у повређеном ткиву, а смањује се концентрација кисеоника, тако се повећава продукција VEGF-а од стране различитих ћелија [96]. Хипоксија побољшава његову експресију, како у моноцитима, тако и у другим ћелијама, као што су кератиноцити, фибробласти, ендотелне ћелије и друге [97]. Акутна краткорочна хипоксија има позитиван утицај на ране фазе зарастања рана, пре свега јер стимулише ангиогенезу и активира ћелије везивног ткива [98].

Поред макрофага у ранама долази до повећања броја мастоцита, и то углавном из суседног ткива. Мастоцити из својих гранула ослобађају низ ускладиштених медијатора [88]. Леукоцити који се прикупаљају у рани појачавају инфламаторни одговор. На крају инфламаторне фазе појављују се Т лимфоцити.

Пролиферативна фаза преклапа се са инфламаторном и карактерише се синтезом колагена од стране фибробласта, који је кључни елемент у фази зарастања ране. Колаген даје чврстоћу и интегритет ткиву. На овај процес надовезују се ангиогенеза, тј. стварање нових крвних судова, контракција и епителизација [90].

Фибробласти се јављају у рани као одговор на медијаторе хемотаксе који се стварају у инфламаторној фази [99]. Обично се јављају око другог дана након настанка ране, а већ четвртог дана постају ћелије које доминирају у рани. Долази до формирања гранулационог ткива. Гранулационо ткиво је младо везивно ткиво које се састоји од капилара, макрофага, фибробласта и везивноткивне строме, која је едематозна због повећане пропустљивости незрелих капилара. Гранулационо ткиво садржи велики број новоформираних крвних судова. Сазревањем гранулационог ткива долази до регресије неких крвних судова и успоставља се равнотежа која је неопходна за нормалан ток зарастања рана [100].

Поред тога фибробласти ослобађају протеогликане и глукозаминогликане, који су важна компонента екстрацелуларног матрикса. Макрофаги у овој фази ослобађају факторе раста неопходне за ангиогенезу и фиброплазију. Формира се мрежа капилара [99].

На крају процеса зарастања рана долази до ремоделовања оштећеног ткива и матурације крвних судова.

2.2.1. Дијабетес и зарастање рана

Бројни локални и општи фактори могу да утичу на процес зарастања ране. Од локалних фактора то су инфекција, присуство страног тела у рани и недовољно снабдевање кисеоником. Од општих фактора на зарастање могу да утичу стрес, старење, поремећај циркулације, конзумирање алкохола, пушење, употреба одређених лекова и постојање многих болести, као што су дијабетес, хепатитис итд. [54].

Хипергликемија доводи до поремећаја у зарастању рана повећањем нивоа крајњих производа гликације (AGEs) [101]. AGEs преко рецептора RAGE промовишу оксидациони стрес, васкуларну инфламацију и прогресију макроваскуларних компликација [102]. Повећана експресија рецептора за AGEs повезана је са отежаним зарастањем рана оралне слузокоже [103]. AGE интеракција са RAGE рецепторима на фибробластима може бити узрок смањеног таложења колагена који је неопходан за нормално зарастање рана [104].

Оксидациони стрес је код дијабетеса последица повећане продукције слободних радикала и смањења капацитета антиоксидационе заштите. Хипергликемија је у основи неколико механизма одговорних за настанак оксидационог стреса [105]. Аутооксидација глукозе је одговорна за стварање слободних кисеоничних радикала ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и OH^{\cdot}). NADPH се троши у полиол путу глукозе и доводи до смањења концентрације редукованог глутатиона, што води ка настанку оксидационог стреса. Глутатион у ћелији регулише активност транскрипционог фактора NF- κ B, одговорног за стимулацију експресије гена чији производи одржавају прооксидационо стање у ћелији. Неензимска гликација протеина смањује каталитичку активност антиоксидационих ензима. Процес гликације хемоглобина доводи до стварања HbA1c који теже отпушта кисеоник, због чега у периферним ткивима настаје хипоксија, која покреће активирање ксантин оксидазе. Оксидациона модификација структурних и функционалних металопротеина доводи до ослобађања метала који укључивањем у Фентонову реакцију стимулишу даљу продукцију радикала.

Најважнији извор слободних радикала у условима хипергликемије су митохондрије и NAD(P)H оксидаза, али и алдехид оксидаза, ксантин оксидаза и глукоза оксидаза [106]. Оксидациони стрес доводи до настанка компликација и отежаног зарастања рана услед оштећења ћелија и поремећене циркулације [107].

Поред тога хипергликемија доводи до смањене пролиферације и абнормалне диференцијације кератиноцита, тако да и на тај начин утиче на процес зарастања рана код оболелих од дијабетеса [108].

С обзиром да макрофаги имају значајну улогу у процесу зарастања рана, отежано зарастање рана код дијабетеса повезано је и са њиховом измењеном активношћу [109]. Макрофаги изоловани из рана оболелих од дијабетеса показују значајан поремећај у ефероцитози, који води већем оптерећењу апоптотичних ћелија у ткиву ране и повећаној

експресији проинфламаторних цитокина [110]. In vivo и in vitro истраживања показала су да хипергликемија стимулише макрофаге да повећају продукцију IL-1 β , IL-6, IL-12 и IL-18 фактора некрозе тумора алфа (TNF α , engl. *tumor necrosis factor-alfa*) и интерферона гама (IFN- γ engl. *interferon-gama*) [110].

Код рана у усној дупљи и на кожи оболелих од дијабетеса фибробласти показују смањену миграцију и пролиферацију, а повећану апоптозу [110].

Дијабетес се повезује са значајно смањеном производњом колагена, која се јавља убрзо након индуковања дијабетеса код експерименталних животиња и специфична је у поређењу са производњом неколагених протеина [111].

Бројни фактори раста који утичу на нормалан ток зарастања рана су дефицитарни код дијабетеса [57]. Продукција епидермалног фактора раста (EGF, engl. *epidermal growth factor*), TGF β 1 и инсулину сличног фактора раста (IGF engl. *insulin-like growth factor*), који су неопходни за нормалан ток зарастања рана у усној дупљи, је смањена код дијабетеса. Са друге стране, постоји повећано ослобађање проинфламаторних цитокина као што су TNF- α и IL-6 [112]. Смањење концентрације епидермалног фактора раста у пљувачци може значајно да поремети зарастање рана у устима и доведе до компликација, тако да примена овог фактора може знатно да утиче на тај процес [113].

Вгет и сарадници [57] су у свом истраживању утврдили да поремећај у стварању VEGF код оболелих од дијабетеса доводи до отежаног зарастања рана. Отежано зарастање рана повезано је се поремећајем ангиогенезе, а посебно са нисходном регулацијом VEGF-а [114].

2.3. ЛАСЕРИ

Ласери се у стоматологији користе још од 60-их година прошлог века кад је Мајман [115] конструисао први рубински ласер. Упоредо са развојем науке и технологије вршена су бројна истраживања о утицају и примени ласера. Ласери се у медицини и стоматологији користе у дијагностичке и терапијске сврхе. Посебно је значајна чињеница да је примена ласера мале снаге потпуно безболна, неинвазивна и без штетних ефеката. Бројне експерименталне и клиничке студије показале су да ласери мале снаге имају утицај

на ћелије, њихову пролиферацију и диференцијацију [116], што је допринело већој заинтересованости за употребу ласера мале снаге у терапији различитих патолошких стања, између осталог и оралног мукозитиса, запаљења, зарастања рана, ангиогенези, итд. [117-119].

Назив ласери је акроним у енглеском језику изведен од речи *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (LASER)*, или у преводу „појачање светлости помоћу стимулисане емисије зрачења“. Ласерско зрачење представља врсту електромагнетног зрачења чије су основне карактеристике [120]:

- монохроматичност,
- кохерентност и
- усмереност.

Монохроматичност представља карактеристику извора да емитује електромагнетно зрачење само једне фреквенције, односно таласне дужине.

Кохерентност означава особину да су сви електромагнетни таласи истог интензитета, усмерења и у истој фази. Кохерентни таласи имају исте правце осциловања и исте фазе или константну фазну разлику.

Усмереност ласерског снопа је последица геометрије система огледала у активној средини у којој се ласерско зрачење генерише. Стимулисана емисија јавља се у правцу нормалном на огледала где су губици услед дифракције најмањи. Ово омогућава фокусирање ласерског снопа на врло малу површину, због чега је могуће простирање снопа на велику даљину са минималним расипањем, при чему су својства монохроматичности и кохерентности очувана.

Параметри који карактеришу поједине ласере су: таласна дужина, енергија, снага ласера, време експозиције и доза зрачења.

Таласна дужина је растојање између најближих тачака таласа које имају исту фазу осциловања и обрнуто је пропорционална фреквенцији простирања таласа.

Енергија коју ласер предаје у току рада изражава се у џулима (J). Енергија је производ средње снаге (P) ласерског зрачења и времена зрачења (t):

$$E = P \cdot t \quad [J = W \cdot s]$$

Време експозиције означава дужину трајања зрачења и изражава се у секундама (s).

Доза зрачења је најзначајнији параметар при одређивању терапије ласерима мале снаге и изражава се или као предата енергија по јединици површине (J/mm^2) или као предата енергија по третираној тачки ($J/тачки$).

2.3.1. Подела ласера

Класификација ласера се може извршити према агрегатном стању активне супстанце, режиму рада и снази емитоване енергије.

- Подела ласера према агрегатном стању активне супстанце

Према агрегатном стању активне супстанце извршена је подела ласера на [121]:

1. гасне ласере,
2. течне ласере и
3. чврсте ласере.

Гасни ласери су ласери код којих је активна супстанца у гасовитом агрегатном стању. У овој групи ласера разликујемо ласере са неутралним атомима, јонске, молекуларне и хемијске ласере.

Течни ласери су ласери код којих је активни медијум у течном агрегатном стању. Течни ласери могу бити на бази неорганских течности или на бази органских боја.

Чврсти ласери су ласери са активном супстанцом у чврстом агрегатном стању која може бити кристална или аморфна.

- Подела ласера према режиму рада

Према режиму рада ласери се деле на [122]:

1. континуиране и
2. пулсне ласере.

Континуиране ласере карактерише континуирана емисија ласерског зрачења која се не мења у току времена, већ од тренутка активације па до престанка рада ласера зрачење има исти интензитет и иста својства.

Пулсне ласере карактерише ласерски сноп издељен на импулсе који трају мање од једне секунде. Код ових ласера емитује се велика енергија у кратком временском интервалу. Дужина трајања једног импулса и време између два суседна импулса, тј. импулсна фреквенца, могу бити различити и могу се подешавати на ласеру.

- Подела ласера према снази емитовања енергије

Према снази емитовања енергије ласери се деле на [123,124]:

1. ласере велике снаге и
2. ласере мале снаге.

Главна разлика између њих огледа се у механизму деловања.

Ласери велике снаге - тврди или високоенергетски ласери, карактеришу се високом густином енергије, фокусирањем ласерског зрачења и израженим термичким ефектима који изазивају денатурацију беланчевина, фотокоагулацију, карбонизацију и испаравање ткива [123]. Због свог дејства користе се у хирургији за вапоризацију, инцизију и каутеризацију [124]. Снага ових ласера износи преко 100 mW (*CO₂*, *Nd: YAG* и *Er: YAG*).

Ласери мале снаге - меки или нискоенергетски ласери, одликују се малом густином, без изражених термичких ефеката, тако да је њихово основно дејство стимулација ћелијске активности (*HeNe*, *GaAs* и *GaAlAs*) [123]. Користе се за стимулацију репарацијских процеса у оштећеном ткиву, у акупунктури и за обнову биоенергетског баланса [124].

2.3.2. Механизам дејства ласера мале снаге

Механизам дејства ласера мале снаге био је предмет бројних истраживања, али није у потпуности разјашњен. Зрачења ласера мале снаге могу имати примарне и секундарне ефекте [13]. Примарни ефекти ласера су фотохемијски, фотоелектрични и фотоенергетски. Секундарни ефекти огледају се у стимулацији ћелијског метаболизма и микроциркулације. Из њих произилазе терапијски ефекти ласера мале снаге: аналгетички, биостимулативни, антиинфламаторни и антиедематозни [13].

У бројним истраживањима је разматран утицај ласера мале снаге на ћелије и ткива, као и на процес зрастања рана.

Ласери мале снаге могу имати стимулативни и инхибиторни ефекат на пролиферацију ћелија. Сматра се да мале дозе зрачења делују стимулативно, док велике дозе делују инхибиторно [125]. Неки аутори сматрају да се стимулативно дејство ласерског зрачења огледа у повећаној пролиферацији ћелија, синтези ДНК и ћелијској адхезији [126-128]. Овај феномен јавља се услед апсорпције енергије од стране митохондријалне цитохром ц оксидазе, која се сматра примарним акцептором ласерског зрачења. Енергија коју митохондрије производе неопходна је за рад ћелије. Митохондрије су извор ензима неопходних за синтезу енергије која се складишти у облику аденозин трифосфата (*adenosine triphosphate-ATP*).

Након излагања ткива зрачењу ласера мале снаге долази до интеракције фотона са ћелијама. Фотони преносе енергију молекулима и долази до стимулације ћелијског метаболизма. Енергија која се преда једном молекулу може да се пренесе на друге молекуле, што изазива реакције у ткиву [129]. Последица апсорпције енергије фотона је повећана синтеза аденозин трифосфата и потрошња кисеоника у митохондријама, као и повећана пропустљивост ћелијске мембране [130].

Утврђено је такође да зрачење ласера мале снаге изазива активацију калцијумских канала, што доводи до повећања концентрације интрацелуларног калцијума и повећања пролиферације ћелија [131]. Повећана концентрација интрацелуларног калцијума делује стимулативно на процесе синтезе ДНК и РНК [132].

Ефекат излагања ћелија великим дозама зрачења је превелико ослобађање калцијума Ca^{2+} , што доводи до хиперактивности калцијумске пумпе и трошења резерви АТР-а, што резултира инхибирањем ћелијског метаболизма [133].

Дуже време експозиције ћелија ласерском зрачењу доводи до оштећења и разређености мреже цитоскелета по целој запремини ћелија, док краткотрајно излагање доводи до промена само по периферији ћелија. Доминантан утицај на оштећење микротубула имају време експозиције и снага ласерског зрачења [134]. Сматра се да је губитак микротубула и микрофиламената последица деполимеризације ових структура под утицајем ласерског зрачења.

На основу истраживања у којима су ћелијске културе излагане ласерима различите таласне дужине, Кагу је утврдила потребу за постојањем тачно специфициране таласне дужине и дозе енергије током одређених терапијских процедура [135].

Ласери мале снаге индукују синтезу и ослобађање бројних молекула, као што су фактори раста, интерлеукини, инфламаторни цитокини и други [116]. Под утицајем ласерског зрачења долази до повећане пролиферације фибробласта [136,137], мезенхималних матичних ћелија [138], кератиноцита [139], *HeLa* ћелија [140], сателитских мишићних ћелија [141], лимфоцита [142], остеобласта [143] и других ћелијских линија.

Испитивања на хуманим гингивалним фибробластима показала су да ласер мале снаге знатно утиче на повећање ћелијског метаболизма и пролиферацију ћелија [144,145]. Kreisler и сарадници [136] су, такође, испитивали утицај ласера мале снаге на пролиферацију хуманих гингивалних фибробласта. Ћелије су зрачене ласером у дози од 1.96-7.84 J/cm², једном, два и три пута недељно у интервалима од 24 часа. Пролиферација ћелија је праћена 24, 48 и 72 часа након зрачења. Резултати истраживања указују да озрачене ћелије показују значајно већу пролиферативну активност у односу на контролу и да су разлике статистички значајно веће 24 часа након зрачења, али и зависне од примењене дозе зрачења.

Mirzaei и сарадници [146] су утврдили да ласер мале снаге у дози од 4 J/cm² статистички значајно повећава пролиферацију фибробласта изолованих из коже дијабетичних пацова.

Basso и сарадници [147] бавили су се испитивањем утицаја InGaAsP ласера мале снаге на хумане кератиноците, које су ласирали три пута у размацима од 24 часа и у дозама од 0.5, 1.5, 3, 5 и 7 J/cm². Резултати истраживања показали су повећање интензитета ћелијског метаболизма при свим дозама зрачења, при чему је посебна ефикасност забележена код доза од 0.5, 1.5 и 3 J/cm². Праћењем ланчане реакције полимеразе у реалном времену (engl. *Realtime polymerase chain reaction-qPCR*) дошли су до резултата да ласер мале снаге стимулише повећање колагена типа I, као и генску експресију васкуларног ендотелног фактора раста, посебно при зрачењу са дозом од 1.5 J/cm².

Damante и сарадници [148] су у свом истраживању користили хумане гингивалне фибробласте како би испитали ослобађање фактора раста под утисајем ласера мале снаге. Ћелије су зрачене два пута у размаку од шест сати, ласерима различитих таласних дужина од 660 и 780 nm у дозама од 3 и 5 J/cm². Резултати су показали да између група не постоји разлика у експресији кератиноцитног фактора раста (KGF engl. *keratinocyte growth factor*), док је експресија базичног фибробластног фактора раста (bFGF engl. *basic fibroblast growth factor*) била знатно повећана код ћелија зрачених ласером таласне дужине од 660 nm. На основу тога закључили су да би повећање експресије овог фактора могао да буде један од механизма којим ласерско зрачење утиче на брже зарастање рана.

Silveira и сарадници [149] су показали да ласер мале снаге може да активира митохондријалне ензиме, као што је цитохром ц оксидаза, и да побољшава процес зарастања рана. Зрачење ласера мале снаге мења инфламаторни одговор, стимулише пролиферацију ћелија и побољшава зарастање коштаног ткива [150, 151]. Ласерско зрачење утиче на пролиферацију макрофага и фибробласта, као и на број крвних судова у рани, како код здравих, тако и код дијабетичних животиња [152]. Ефекат зрачења огледа се и у знатном повећању концентрације колагених влакана и бржем зарастању рана на кожи експерименталних пацова [153-155]. Већа експресија колагена и еластичних влакана под утицајем ласера посебно је изражена у раној фази процеса зарастања [156].

Reis и сарадници [157] су истраживали утицај ласера мале снаге на зарастање рана на кожи пацова, самостално и у комбинацији са дексаметазоном. Најбоље резултате у погледу повећања колагених влакана, организацији екстрацелуларног матрикса и повећању броја фибробласта добили су у групи пацова код којих је примењиван само ласер мале снаге.

Lopes и сарадници [158] су испитивали антиинфламаторни ефекат ласера мале снаге на експериментално изазваном оралном мукозитису, са посебним освртом на синтезу колагена и редукцију запаљенског инфилтрата.

Reddy и сарадници [159] су истраживали утицај ласера на зарастање рана на кожи пацова са експериментално индукованим дијабетесом. Примењивали су He: Ne ласер таласне дужине 632.8 nm у дози од 1 J/cm², пет пута недељно у периоду од три недеље, односно све до зарастања рана. На основу мерења биомеханичких особина третираних

рана и биохемијских налаза закључили су да ласер значајно поспешује зарастање убрзавањем процеса стварања колагена и повећањем стабилности везивног ткива.

Најзначајније промене у ранама под утицајем ласерског зрачења огледају се у повећаној количини гранулационог ткива, пролиферацији фибробласта, раној епителизацији и повећаној неоваскуларизацији [160].

3. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Циљеви овог истраживања били су следећи:

- испитивање ефекта ласера мале снаге на вијабилност, раст и морфолошке карактеристике *HeLa* ћелија у култури;
- оцена ефикасности ласера мале снаге на зарастање рана оралне слузокоже код експерименталних животиња са индукованим дијабетесом;
- утврђивање повезаности зарастања рана са концентрацијом васкуларног ендотелног фактора раста у ткиву;
- испитивање ефекта ласера мале снаге на показатеље оксидационог стреса и антиоксидационе заштите у плазми експерименталних животиња.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Истраживање је одобрено од стране Етичког комитета Медицинског факултета у Приштини са седиштем у Косовској Митровици одлуком број 05-1594 као и Етичког комитета Медицинског факултета у Нишу одлуком број 01-2625-1. Истраживања су обављена на Медицинском факултету у Нишу, Научноистраживачком Центру за биомедицину и Институту за биохемију Медицинског факултета у Нишу, Институту за патологију и Институту за биохемију Медицинског факултета Приштина са седиштем у Косовској Митровици.

4.1. *IN VITRO* ИСПИТИВАЊЕ НА ЋЕЛИЈСКОЈ КУЛТУРИ

4.1.1. Ћелијска култура

In vivo истраживању претходила је *in vitro* анализа. Методе са ћелијским културама не могу заменити експерименте на животињама, али се број експеримената на животињама може редуковати употребом ћелијске културе.

Утицај ласера мале снаге на вијабилност, раст ћелија и морфометријске карактеристике ћелијске културе (облик и густину на површини на којој расте) праћен је стандардним МТТ тестом и микроскопски, уз примену одговарајућег софтвера.

Испитиван је ефекат ласера мале снаге на *HeLa* ћелијску културу. *HeLa* ћелије представљају бесмртни тип ћелијске линије које су први пут изоловане из канцера грлића материце пацијенткиње **Henriete Laks**, у чију част су и добиле име [161]. Ове ћелије се често користе у научним истраживањима због своје издржљивости и великог потенцијала деобе. Чувају се замрзнуте у течном азоту, одакле се одмрзавају и култивуши за потребе експеримената. *HeLa* ћелије се могу користити као модел епителних ћелија и то је био разлог за њихов избор у овом истраживању ефеката ласерског зрачења на оралну слузокожу.

Поступак рада са *HeLa* ћелијском културом за експерименте састојао се у следећем:

- Услови култивације *HeLa* ћелија

HeLa ћелијска култура је одржавана у хранљивом медијуму (DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL, UK) који је садржао L-глутамин, 10% фетусни говеђи серум (FCS, engl. *fetal calf serum*,) и антибиотике - 100 IU/ml пеницилина и 100 µg/ml стрептомицина. Култивација ћелија је вршена у инкубатору (Binder, Germany), у атмосфери засићеној воденом паром са 5% CO₂, на температури од 37°C.

- Бројање вијабилних ћелија

За испитивање вијабилности ћелија у епендорфицу је одмерено 50 µl ћелијске суспензије и 50 µl Трипан плаве боје (Трипан blue) и остављено 5 минута пре бројања ћелија. Мртве ћелије се због уласка боје кроз дезинтегрисану ћелијску мембрану боје у плаво, а живе ћелије остају необојене. У сврху бројања ћелија, суспензија ћелија у боји нанета је на ивицу хемоцитометарске *Malassez* коморе у којој се узорак разлио, а онда је извршено бројање у одговарајућим пољима. Број ћелија израчунат је на следећи начин:

Добијени број ћелија у 10 квадрата $\times 10 \times 2 \times 1000 =$ Укупан број ћелија у 1 ml

Општа формула за израчунавање броја ћелија изгледа овако:

$$\text{Број ћелија / ml} = n \times P \times R \times 1000$$

n – Број ћелија у површини P,

P – део површине који се броји (100 квадрата / број квадрата за бројање),

R – разблажење,

фактор 1000 - да би се добио број ћелија у 1 ml.

- Пасажа ћелијске културе

Пасажа ћелија је вршена тако што је узето 2 ml TRIPSIN+EDTA раствора и додато у фласк како би се ћелије одвојиле од дна. Провера је извршена на фазно-контрасном

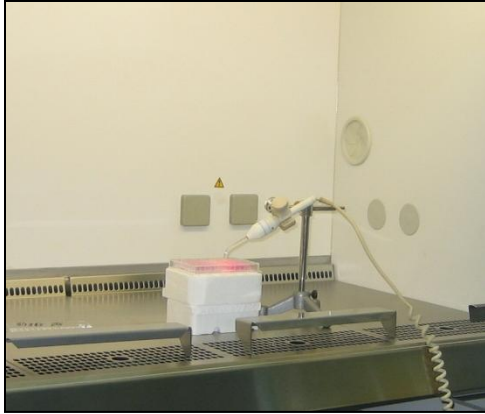
микроскопу. Након одвајања ћелија од дна флашка трипсинизација је прекинута додавањем HANKS-а и сав садржај је извучен из флашка и стављен у стерилну епрувету, где се садржај ресуспендовао. Епрувета са пасажираним ћелијама је стављена у центрифугу на +4°C и извршено центрифугирање 10 мин. на 1,200 обртаја/мин (Hettich Zentrifugen Universal 320R, Germany). Након центрифугирања у епрувету је додато 2 ml DMEM-а и добро ресуспендовано.

- Постављање културе за експеримент

Ћелије су сађене у стерилну плочу за култивацију ћелија са 96 бунарчића. По једном бунарчићу је посађено 1×10^4 ћелија у 200 μ l DMEM-а. Након инкубације од 24 часа вршено је зрачење ћелија.

4.1.1.1. Протокол зрачења ћелијске културе

HeLa ћелије зрачене су према утрђеној шеми и то на два начина: 1) одозго, кроз култивациони медијум, у стерилној вертикалној комори (*Thermo Scientific, United States*) и 2) одоздо, преко дна култивационе плоче, ван стерилне коморе. За потребе зрачења, плоча са ћелијама постављена је у хоризонтални положај, а оптички вод ласера постављен у специјално направљен држач. У ламинарној комори ћелије су зрачене одозго, након што је поклопац култивационе плоче скинут, а оптички вод је постављен на улаз у бунарчић, тако да је зрачење вршено кроз култивациони медијум (слика 1). У другом начину ћелије су зрачене истим дозама и по истој шеми, али ван ламинарне коморе, кроз дно култивационе плоче (слика 2). Коришћен је ласер таласне дужине 658 nm, у континуираном моду, снаге 7 mW, са оптичким водом површине попречног пресека 0.196 cm² (*Scorpion Dental Optima, Optica Laser, Sofia, Bulgaria*). Примењене су три различите дозе зрачења: 4 J/cm², 8 J/cm² и 16 J/cm². Поред група култура које су зрачене, постојале су и контролне групе. Зрачење је вршено три пута у размацима од по 24h, а после сваког зрачења ћелије су враћане у инкубатор. Након 24h од последњег зрачења рађен је МТТ тест за пролиферацију ћелија.



Слика 1. Зрачење хелија кроз култивациони медијум



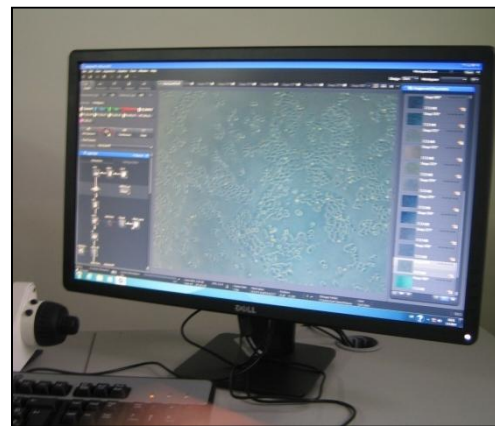
Слика 2. Зрачење хелија кроз дно култивационе плоче



Слика 3. Вишеканални фотометар (Multiskan Ascent No354, Thermo Labsystems, Finska)



Слика 4. Инвертни микроскоп Observer Z1, Carl Zeiss, Germany.



4.1.1.2. МТТ тест ћелијске вијабилности и пролиферације

МТТ тест заснива се на активности ензима сукцинат-деhidрогеназе који је саставни део митохондријалног респираторног ланца вијабилних ћелија. Наведени ензим редукује жуту тетраволумезолијумову со ((3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolijum bromide-МТТ)) до формазана, једињења плаве боје, које се у виду кристала таложи у ћелијама. Медијум у коме су инкубирани ћелије извучен је по завршетку 24h инкубације након последњег зрачења, ћелије су испране са 100 µl PBS-a (Phosphate Buffered Saline) и додато је по 20 µl МТТ-а. Након 2h инкубације на 37°C настали кристали формазана растворени су додатком 100 µl изопропанола. Спектрофотометријско мерење редукције МТТ-а вршено је на оптичкој густини од 550 nm на вишеканалном фотометру (Multiskan Ascent No354, Thermo Labsystems, Finska) (слика 3). Спектрофотометријски прочитан интензитет плаве боје, након екстракције формазана, директно је пропорционалан броју вијабилних ћелија.

4.1.1.3. Светлосна микроскопија

Вијабилност, густина и епителна организација *HeLa* ћелија су опсервиране под инвертним микроскопом на фазно-контрастном светлу (Observer Z1, Carl Zeiss, Germany) (слика 4).

4.2. IN VIVO ИСТРАЖИВАЊЕ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИМ ЖИВОТИЊАМА

Истраживање на експерименталним животињама обављено је у складу са Хелсиншком декларацијом. Као експерименталне животиње коришћени су пацови Вистар (Wistar) соја, мушког пола, телесне тежине од 260 до 330 g. Пацови су одабрани методом случајног избора из окота са Војномедицинске академије. Животиње су током трајања експеримента чуване по принципима Европске конвенције о заштити кичмењака који се користе у експерименталне и друге научне сврхе (CoE- ETS 123) и према одредбама Закона о добробити животиња Републике Србије ("Сл. гласник РС", бр. 41/2009). Смештај, исхрана и надзор обезбеђени су од стране Виваријума Медицинског факултета у Нишу. У току трајања експеримента животиње су чуване у условима са слободним приступом води и храни - *ad libitum*. Чуване су у жичаним кавезима, у просторији са температуром ваздуха одржаваном на 21 - 23°C, циркадијалном ритму са сменом светла и таме на 12 h.

Истраживање је било подељено у три фазе. У првој фази истраживања животињама је мерена телесна тежина и одређивана гликемија у крви, а након тога је код 50% случајно одабраних пацова индукован дијабетес. У другој фази експеримента животињама одређених група прављене су улцерације (дубоки дефект) на образној слузокожи на којима је примењиван ласер мале снаге код одређених животиња. У трећој фази истраживања су жртвоване животиње и узимано ткиво и крв за патохистолошке и биохемијске анализе.

4.2.1. Прва фаза експеримента

У првој фази експеримента све животиње су биле измерене и њихове телесне тежине забележене. Свакој животињи је пре почетка експеримента одређен ниво шећера у крви након гладовања од 12 часова. Крв је узимана из репне вене док су животиње биле у будном стању, а гликемија мерена помоћу апарата за мерење гликемије *Accu-Chek Performa Roche Diagnostics, Germany*.

Половини случајно одабраних пацова експериментално је индукован дијабетес једном интраперитонеалном дозом алоксана (150 mg/kg телесне тежине) (Alloxan monohydrate, Abscam Inc. USA) раствореног у стерилном физиолошком раствору. Пре почетка експеримента животиње су гладовале 12 часова, јер је доказано да се на тај начин повећава осетљивост животиња на алоксан.

Протокол за индуковање дијабетеса:

Протокол за експериментално индуковање дијабетеса алоксаном састојао се у следећем:

- пре давања ињекције измерена је гликемија узорковањем крви из репне вене;
- раствор алоксана добијан је растварањем праха у стерилном физиолошком раствору;
- алоксан је примењиван у дози од 150 mg/kg телесне тежине, интраперитонеално једнократно;
- животињама је након ињекције даван 10% раствор глукозе у наредна 24 часа, како би се спречила појава конвулзија и смрт, која је честа у хипогликемијској фази; након 24 часа глукоза је замењена водом;
- након 72 часа мерена је гликемија у крви и животиње код којих су измерене вредности прелазиле 11.1 mmol/l (200 mg/dl) сматране су животињама са дијабетесом.

Пацови су након тога случајним одабиром подељени у групе од по 18 животиња које су имале дијабетес или су биле здраве. Формиране групе пацова су смештене у посебне кавезе и пацови су затим чувани у условима *ad libitum* све до извођења другог дела експеримента.

Животиње су биле подељене у следећих 6 група:

- *група I*: 18 експерименталних животиња, здравих, нетретираних, које представљају контролну групу;
- *група II*: 18 експерименталних животиња, здравих, којима је направљена улцерација на образној слузокожи која је остављена да спонтано зараста;

- *група III*: 18 експерименталних животиња, здравих, којима је направљена улцерација и код којих је примењиван ласер мале снаге;
- *група IV*: 18 експерименталних животиња којима је индукован дијабетес и на којима даље нису извођене експерименталне процедуре, које представљају контролну дијабетичну групу;
- *група V*: 18 експерименталних животиња којима је индукован дијабетес, а затим направљена улцерација која је остављена да спонтано зараста;
- *група VI*: 18 експерименталних животиња којима је индукован дијабетес, направљена улцерација, а затим примењиван ласер мале снаге.

4.2.2. Друга фаза експеримента

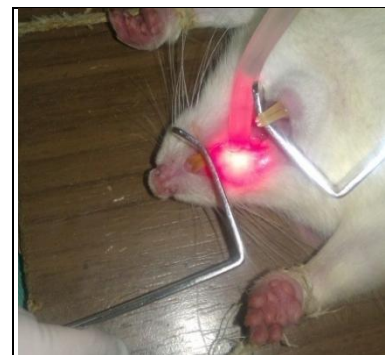
Друга фаза експеримента започета је четири недеље након утврђивања дијабетеса код експерименталних пацова. На почетку друге фазе свим пацовима поново су мерене телесна тежина и гликемија, а добијене вредности забележене. Након тога животиње које су припадале групама којима се праве улцерација биле су уведене у општу анестезију, а као анестетик употребљаван Ketamidol (Richter Pharma AG, Wels, Austria). Пре почетка процедуре прављења улцерације, слузокожа образа и усне дупље је била очишћена 0.12% хлорхексидином (Hibideks® DAP, Galenika a.d., Србија). Улцерација пречника 6 mm је прављена на образној слузокожи са десне стране одговарајућим хируршким инструментима по методи која је описана у литератури (слика 5) [162]. Ткиво образне слузокоже је ексцидирано скалпелом по. 15.



Слика 5. Инструменти који су коришћени у експерименту



Слика 6. Улцерација на образној слузокожи



Слика 7. Примена ласера мале снаге

Након прављења улцерације крварење је заустављено компресијом стерилном газом (Слика 6). Све улцерације снимане су дигиталним фотоапаратом (Canon PowerShot SD300, Japan) непосредно након заустављања крварења, као и на дан жртвовања. Сlike су коришћене за мерење површине ране, изражене у cm^2 , и праћење тока зарастања коришћењем компјутерског софтвера *Image J Software* (RSB, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). Измерена површина је затим трансформисана у проценте зарастања ране коришћењем формуле [163,164]:

$$\frac{(\text{рана 0.дан} - \text{рана X. дан})}{\text{рана 0.дан}} \times 100\%$$

X - дан жртвовања животиња

Животиње код којих није примењиван ласер су одмах након хемостазе враћане у кавезе, док је код животиња треће и шесте групе примењиван ласер мале снаге (Scorpion Dental Optima, Optica Laser, Sofia, Bulgaria) (слика 7).

Протокол за ласеротерапију:

Коришћен ласер припада ласерима који имају биостимулативно дејство и примењују се за стимулацију репараторних процеса у оштећеном или оболелом ткиву. Припада ласерима видљивог црвеног спектра, таласне дужине 630-670 nm, излазне снаге 1-25 mW, са могућношћу континуираног и пулсног мода (режима рада) са фреквенцом од 1-1,000 Hz и могућношћу програмирања времена од 1-99 min 59 s.

Ласеротерапија је извођена уз примену одговарајућег оптичког додатка површине попречног пресека 0.196 cm^2 , у дози од 6 J/cm^2 , у континуираном моду, на удаљености од 1 mm од слузокоже. Прва доза зрачења примењена је одмах након завршетка интервенције и заустављања крварења, а понављана је сваки други дан у наредних 10 дана, тј. до жртвовања последње групе животиња које су примале ласеротерапију.

4.2.3. Трећа фаза експеримента

Пацови су жртвовани периодично трећег, седмог и десетог дана од почетка друге фазе експеримента. На дан жртвовања пацовима су поново мерене телесна тежина и гликемија, а добијене вредности забележене. Жртвовање је обављено великом дозом анестетика, а жртвовано је по 6 животиња из сваке групе. Експерименталне животиње прве и четврте групе, односно здраве и животиње са индукованим дијабетесом, представљале су контролне групе.

4.2.3.1. Припрема ткива за патохистолошку анализу

Један део ткива - ране је фиксиран у 10% пуферованом формалину током 48 часова. Након тог времена извршена је припрема ткива за патохистолошку анализу. Протокол за припрему ткива састојао се у следећем (слика 8):



Слика 8. Припрема ткива за патохистолошку анализу ткива

1. фиксација-формалин 10% - 48h;
2. дехидратација ткива кроз серију алкохола растуће концентрације:
 - 70% етанол
 - 80% етанол
 - 95% етанол
 - 100% етанол
3. просветљавање ткива - потапање ткива у растварач (бензол);
4. импрегнација парафином;
5. калупљење у растопљени парафин (58°C) (Leica EG1150H, Microsystems, Germany).



Слика 9. Диспензер за парафин са топлом и хладном плочом (Leica EG1150H, Leica EG1150C, Microsystems, Germany) (лево) и ротациони микротом (Leica RM2125RT, Microsystems, Germany) (десно).

Након калуљења ткива уз помоћ диспензера за течни парафин са топлом и хладном плочом (Leica EG1150H, Leica EG1150C, Microsystems, Germany), калупи су сечени на ротационом микротому марке Leica (Leica RM2125RT, Microsystems, Germany) на дебљину од 4-5 μm (слика 9). Ткиво је бојено стандардном хематоксилин и еозин методом (ХЕ) и Masson trichrom методом.

Хематоксилин је базна боја која киселе структуре ткива боји плаво, док еозин представља киселу боју која боји у различите нијансе црвене позитивно наелектрисане структуре, као што је цитоплазма.

Бојење ткива рутинском хематоксилин еозин методом обављено је на следећи начин:

- депарафинисани резови допремани су до воде;
- ксилол;
- дехидратација у алкохолима опадајуће концентрације (апсолутни алкохол па 96% етанол);
- испирање у дестилованој води;
- бојење у раствору хематоксилина;
- испирање у текућој води;
- испирање у дестилованој води;
- бојење у раствору еозина;

- дехидратација у алкохолима растуће концентрације (96% етанол и апсолутни алкохол);
- стављање у ксилол;
- монтирање DPX–om (DPX Mountant, Sigma-Aldrich Chemie GmbH).

Бојење ткива Masson trichrom методом је коришћено како би се поједине структуре дефинисале различитим бојама. Коришћен је протокол са хематоксилином по Weigert-у и фосфомолибденском киселином. Бојење је обављено на следећи начин:

- дехидратација у алкохолима опадајуће концентрације (апсолутни алкохол па 96% етанол);
- испирање у дестилованој води;
- бојење у раствору Weigert хематоксилина;
- испирање у дестилованој води;
- бојење у раствору А и Б
- испирање у дестилованој води;
- 1% фосфомолибденска киселина;
- раствор Ц;
- испирање у дестилованој води;
- дехидратација у алкохолима растуће концентрације (96% етанол и апсолутни алкохол);
- стављање у ксилол;
- монтирање DPX–om (DPX Mountant, Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

Након бојења, анализа и сликање препарата вршена је на микроскопу марке Leica (Leica, Microsystems, Germany) и помоћу дигиталног фотоапарата марке Canon PowerShot S70 (Canon UK).

У оквиру интерпретације патохистолошких препарата анализирано је присуство некрозе, неутрофила, макрофага, лимфоцита, плазмоцита, гранулационог ткива, фибробласта и степен васкуларизације [165,166]. Патохистолошки параметри су

скоровани од 0 - 3, на следећи начин: 0 - није присутно, 1- благо присуство, 2 - умерено и 3 - изражено присуство.

4.2.3.2. Имуноесеј за квантификацију васкуларног ендотелног фактора раста

Узимање и припрема узорака

Након жртвовања експерименталних животиња део ткива (улцерације) је одмах након узимања стављен у индивидуалне епендорф епрувете и замрзаван на -80°C до извођења биохемисјких анализа. Пре стављања узорка, епрувете су прецизно мерене како би се одредила тежина сваког узорка.

Експериментални протокол за сендвич ензим имуноесеј технику - ELISA

Васкуларни ендотелни фактор раста је одређиван комерцијалном квантитативном методом сендвич ензим имуноесеј техником (ELISA test). ELISA је врста биохемијске анализе која се користи за квалитативно и квантитативно одређивање супстанци, обично протеина, у хетерогеним растворима. Основа овог поступка је имунохемијска реакција антиген-антитело. Уколико испитивана супстанца није у раствору већ у ткиву, потребно је да се преведе у течну фазу да би могао да се примени ELISA метод.

Узорци ткива су хомогенизовани у TRIS пуферу и справљен је 10% хомогенат. Добијени хомогенат је центрифугиран на 14,000 обртаја у трајању од 10 min на температури од $+4^{\circ}\text{C}$ (Eppendorf Centrifuge 5417R, Germany). Добијени супернатант је издвојен за сваки узорак и чуван у замрзивачу на -80°C до анализе.

За одређивање нивоа VEGF у ткиву, примењен је комерцијални ELISA комплет *Rat VEGF Quantikine ELISA Kit* (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA).



Слика 10. Припрема стандарда и контроле



Слика 11. Biochrom Asys Atlantis microplate washer, UK

Сви реагенси, стандарди, контрола и узорци припремљени су према упутству произвођача (слика 10). У сваки бунарчић је прво додато по 50 μL растварача RD1- 41, а затим по 50 μL стандарда, контроле и узорка у одговарајући бунарчић према раније утврђеној шеми. Након тога плејт је остављен да се инкубира на хоризонталном орбиталном шејкеру (Orbital Shaker, Ratek Instruments Pty Ltd, Australia) подешеном на 500 \pm 50 rpm, на собној температури, заштићен од светлости. Након инкубације уследило је испирање детергентом и овај поступак је понављан укупно 5 пута (Biochrom Asys Atlantis microplate washer, UK) (слика 11). Након последњег испирања сав заостали пуфер је уклоњен, а у сваки бунарчић је додато по 100 μL Rat VEGF Conjugate-a. Прекривено је новом заштитном траком и остављено да се инкубира на собној температури, на шејкеру, још сат времена. Након тога поново је извршено испирање. Затим је у сваки бунарчић додато по 100 μL супстрата и остављено 30 min на собној температури, заштићено од светлости. По истеку времена у сваки бунарчић је додато по 100 μL стоп раствора и извршено читање на оптичкој густини од 450 nm, на вишеканалном фотометру (Multiskan Ascent No354, Thermo Labsystems, Finska). Израчунавање концентрације VEGF извршено је на основу конструиране стандардне криве. Добијене вредности су приказане у односу на mg протеина у супернатанту хомогената.

4.2.3.3. Показатељи оксидационог стреса и антиоксидационе заштите

Приликом жртвовања пацовима је кардијалном пункцијом узимана крв за биохемијске анализе у епруветама са етилен диамин тетра сирћетном киселином (*Vacutainer* EDTA, *Venosafe*® Plastic Tubes, Terumo Europe). Крв је центрифугирана на +4 С°, 10 минута на 2500 обртаја у минути (*Hettich Universal 320R Centrifuge*, Germany). Плазма која се издвојила је затим одвајана у епендорф епрувете и замрзавана на -20 С° до извођења биохемијских анализа. Одређиване су вредности Тоталног Оксидационог Статуса (ТОС), Тоталног Антиоксидационог Капацитета (ТАК), индекс оксидационог стреса - ОСИ (engl. *oxidative stress index*) и каталитичка активност супероксид дизмутазе (СОД).

1. Тотални Оксидациони Статус (ТОС)

Одређивање тоталног оксидационог статуса се базира на способности оксиданаса да оксидују двовалентно гвожђе из комплекса са о-дианизидином у тровалентно. Фери јони стварају обојени комплекс са ксиленол наранџастим у киселој средини. Интензитет настале боје се мери спектрофотометријски, и повезан је са концентрацијом оксиданаса присутних у узорку.

За одређивање тоталног оксидационог статуса користи се 0.225 mL реагенса 1 (ксиленол оранж 150 μM , NaCl 140 mM и глицерол 1.35 M у 25 mM H_2SO_4 , pH=1.75), 0.035mL плазме (анализа) или стандардног раствора (стандард) и 0.011 mL реагенса 2 (феро амонијум сулфат 5 mM и о-дианизидин 10 mM у 25 mM H_2SO_4 [167]).

Апсорбанса се чита на спектрофотометру на 560 nm два пута. Најпре, као слепа проба анализе или стандарда након мешања реагенса 1 и плазме односно стандардног раствора. Након 4 минута од додавања реагенса 2 чита се апсорбанса анализе односно стандарда. Реакција се изводи на собној температури (25°С).

Резултати тоталног оксидационог статуса се изражавају у $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ еквивалената/L према стандардном раствору (водени раствор H_2O_2 од 10 $\mu\text{mol / l}$).

Тотални оксидациони статус (ТОС) ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ еквивалената/L) =

$$\frac{\text{Апсорбанса анализе}}{\text{Апсорбанса стандарда}} \times \text{концентрација стандардног раствора}$$

2. *Одређивање Тоталног Антиоксидационог Капацитета (ТАК) мерењем фери-редуктивне способности плазме - The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP)*

Анализа *FRAP* је колориметријска метода за испитивање скевенџерске способности антиоксиданаса. Базира се на способности антиоксиданаса да редукују Fe^{+3} из комплекса 2,4,6-фери-трипиридил-С-триазин (ТРТЗ) у Fe^{+2} [168]. *FRAP* анализа је метода за мерење фери редуктивне способности плазме, где се при ниском рН Fe^{+3} -ТРТЗ редукује у Fe^{+2} -ТРТЗ, при чему се формира интензивно плава боја са максимумом апсорпције на 593 nm.

За одређивање фериредуктивне способности испитиваног узорка користи се 1 ml радног *FRAP* реагенса (припрема се мешањем 25 ml ацетатног пуфера (300 mmol/L рН 3.6), 2.5 ml раствора ТРТЗ (2,4,6-фери-трипиридил-С-триазин (ТРТЗ) 10 mmol/L у 40 mmol/L HCl) и 2.5 ml раствора FeCl_3 (20 mmol/L) коме се дода одговарајућа количина од 0.05 ml плазме (анализа) или стандардног раствора (стандард).

Реакциона мешавина се инкубира 6 минута на 25°C, затим се прочита апсорбанса на спектрофотометру на 593 nm, према слепој проби која садржи радни *FRAP* реагенс.

Резултати Тоталног Антиоксидационог Капацитета плазме се изражавају у $\mu\text{mol FeSO}_4$ еквивалената/L према стандардном раствору (раствор $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ од 300 $\mu\text{mol/L}$ у метанолу).

Тотални антиоксидациони капацитет (ТАК) ($\mu\text{mol/L FeSO}_4$ еквивалената/L) =

$$\frac{\text{Апсорбанса анализе}}{\text{Апсорбанса стандарда}} \times \text{концентрација стандардног раствора}$$

3. Индекс оксидационог стреса (ОСИ)

Израчунава се из вредности ТАК и ТОС на следећи начин:

$$\text{ОСИ (арбитрарне јединице)} = \frac{\text{ТОС } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ еквивалената/L})}{\text{ТАК } (\mu\text{mol FeSO}_4 \text{ еквивалената/L})} \times 1,000$$

4. Одређивање каталитичке активности супероксид дизмутазе (СОД)

Активност супероксид дизмутазе (ЕС 1.15.1.1) одређивана је спектрофотометријски, по методи Misra и Fridovich-a [169].

Ова метода за одређивање активности супероксид дизмутазе (СОД) се базира на инхибицији стварања адренохрома у току спонтане оксидације адреналина у базној средини.

Иницирајући догађај ланчане реакције је једновалентна оксидација анјона адреналина изазвана металним катјоном или супероксид анјоном. Редуковани метални катјон, настао у току иницијације ланчане реакције, може бити оксидован помоћу молекулског кисеоника, при чему такође настаје супероксид анјон. Супероксид дизмутаза уклањањем супероксид анјона прекида ланчану реакцију аутооксидације адреналина, а тиме и стварање адренохрома. При томе је степен инхибиције стварања адренохрома сразмеран активности ензима.

Брзина стварања адренохрома се прати спектрофотометријски на таласној дужини од 480 nm, на којој је моларни апсорпциони коефицијент за адренохром $4.02 \times 10^3 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Додавањем 200 μL адреналина (Л-адреналин Д-хидрогентагтарат ($\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$) 7mmol/L, водени раствор) реакционој мешавини, која се састојала од 1,000 μL пуфера (0.05 mol/L глицински пуфер (0.2 mol/L глицина и 0.2 mol/l NaOH) pH 10.2) и 20 μL узорка, започета је реакција инхибиције спонтане оксидације адреналина. Реакција се одвијала на температури од 25°C. Брзина стварања адренохрома је праћена спектрофотометријски на таласној дужини од 480 nm у трајању од 3 минута. Инхибиција

спонтане оксидације адреналина је одређена у односу на вредност промене апсорбансе исте реакционе мешавине у коју је уместо плазме додавана дестилована вода (контрола).

Јединица активности супероксид дизмутазе (U) је дефинисана као количина ензима која за 50% инхибира спонтану оксидацију адреналина у минути при наведеним условима. Активност супероксид дизмутазе изражена је као $U \times 10^3/L$ (kU/L) плазме.

5. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

За анализу примарних података коришћене су дескриптивне статистичке методе и методе за тестирање статистичких хипотеза.

Од дескриптивних статистичких метода коришћене су за континуиране варијабле мере централне тенденције (аритметичка средина и медијана), мере варијабилитета (стандардна девијација), минимална (Min) и максимална (Max) вредност а категоријалне варијабле су приказане као апсолутни и релативни бројеви.

За сваку варијаблу је оцењена нормалност дистрибуције података Shapiro-Wilk тестом и хомогеност варијанси Levene тестом.

За тестирање хипотезе о значајности разлике средњих вредности нумеричких обележја која су имала нормалну расподелу и хомогеност варијанси коришћен је Студентов т тест за независне узорке за тестирање разлике између две групе а за поређење разлике између три и више група коришћена је једнофакторска анализа варијансе - ANOVA са Tukey posthoc тестом. За ординалне варијабле и нумеричке, у случају када дистрибуција вредности обележја није испуњавала критеријуме нормалне расподеле и хомогеност варијанси, коришћене су непараметарске методе за поређење између две групе Mann-Whitney U test - тест суме рангова и за поређење између три и више група Kruskal-Wallis-ov тест.

За испитивање повезаности коришћен је Spearman-ов коефицијент корелације. Статистичке хипотезе су тестиране на нивоу статистичке значајности (алфа ниво) од 0.01 и 0.05.

За статистичку обраду резултата коришћен је софтверски програм SPSS Statistics 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

6. РЕЗУЛТАТИ

6.1. РЕЗУЛТАТИ *IN VITRO* ИСПИТИВАЊА

6.1.1. Резултати МТТ теста

Испитиван је утицај различитих доза зрачења на пролиферацију *HeLa* ћелија. У примењеном МТТ тесту проценат апсорбанце сразмеран је расту ћелија у култури.

HeLa ћелије зрачене су према утврђеној шеми и то у два одвојена типа експеримента, у ламинарној комори, кроз култивациони медијум и ван ламинаране коморе, кроз пластично дно култивационе плоче.

Измерене апсорбанце три контролне културе од по четири понављања, које су биле размештене по целој култивационој плочи, послужили су за израчунавање криве зависности апсорбанце од позиције бунарчића на култивационој плочи. На основу наведене криве израчунате су очекиване вредности контроле за позиције на којима су били зрачени бунарчићи. Резултат експеримента је коначно изражен као однос измерене просечне апсорбанце за тетрапликат бунарчића озрачен једном дозом и на претходни начин објашњено израчунату претпостављену апсорбанцу контроле на истој позицији на култивационој плочи (табела 3).

Табела 3. Вредности интензитета редукције МТТ-а у односу на примењену дозу зрачења кроз култивациони медијум

Група	\bar{x}	SD	Med	Min	Max	p
Контрола	0.88	0.03	0.88	0.84	0.92	
4 J/cm ²	0.95	0.02	0.96	0.93	0.96	p<0.001*
8 J/cm ²	1.14	0.05	1.12	1.05	1.19	
16 J/cm ²	0.78	0.09	0.83	0.62	0.84	

\bar{x} - Аритметичка средина, SD- Стандардна девијација, Med- Медијана, *статистичка значајност

Код зрачења кроз култивациони медијум аритметичка средина интензитета редукције МТТ-а код контроле износи 0.88 ± 0.03 , код дозе од 4 J/cm² је 0.95 ± 0.02 , код дозе

од 8 J/cm² износи 1.14±0.05, и код дозе од 16 J/cm² је 0.78±0.09. Између свих група постоји статистички значајна разлика аритметичких средина (F=58.419, df=3/31, p<0.001).

Разлика аритметичких средина интензитета редукције МТТ-а је статистички значајна између контроле и дозе од 8 J/cm² (p<0.001), контроле и дозе од 16 J/cm² (p=0.008), затим између дозе од 4 J/cm² и дозе од 8 J/cm² (p<0.001), дозе од 4 J/cm² и дозе од 16 J/cm² (p<0.001) као и између дозе од 8 J/cm² и дозе од 16 J/cm² (p<0.001) али није статистички значајна између контроле и дозе од 4 J/cm² (p=0.062).

Под претпоставком да је измерена апсорбанца зависна само од броја ћелија, на описани начин добијени резултати показују да доза од 8 J/cm² показује благи стимулаторни ефекат на тродневни раст *HeLa* ћелија, да је доза од 4 J/cm² најприближнија вредностима контроле, а да доза од 16 J/cm² показује благи инхибиторни ефекат на тродневни раст *HeLa* ћелија. Добијена апсорбанца може бити и под утицајем метаболичког стања ћелија зависног од активности митохондрија, па у таквој претпостављеној биолошкој ситуацији ови резултати значе да су *HeLa* ћелије метаболички најактивније под третманом дозом од 8 J/cm², а најмање метаболички активне под третманом дозом од 16 J/cm².

У другом експерименту ћелије су зрачене ласером преко пластике дна култивационе плоче, одоздо, у три дозе и према истој шеми као и у претходном описаном експерименту. Начин рада, мерења и израчунавања резултата су такође били идентични као и у претходном експерименту, а добијени подаци су представљени су у табели 4.

Табела 4. Вредности интензитета редукције МТТ-а у односу на примењену дозу зрачења кроз дно култивационе плоче

Група	\bar{x}	SD	Med	Min	Max	p
Контрола	0.84	0.07	0.87	0.73	0.91	p<0.001*
4 J/cm ²	1.19	0.01	1.19	1.18	1.21	
8 J/cm ²	1.18	0.03	1.18	1.11	1.21	
16 J/cm ²	0.74	0.06	0.75	0.65	0.82	

\bar{x} - Аритметичка средина, SD- Стандардна девијација, Med- Медијана, *статистичка значајност

Код зрачења ван ламинарне коморе, односно кроз дно култивационе плоче, аритметичка средина интензитета редукције МТТ-а код контроле износи 0.84±0.07, код

дозе од 4 J/cm^2 је 1.19 ± 0.01 , код дозе од 8 J/cm^2 износи 1.18 ± 0.03 , и код дозе од 16 J/cm^2 је 0.74 ± 0.06 . Између група постоји статистички значајна разлика аритметичких средина интензитета редукције МТТ-а ($F=170.519$, $df=3/31$, $p<0.001$).

Разлика аритметичких средина интензитета редукције МТТ-а је статистички значајна између контроле и дозе од 4 J/cm^2 ($p<0.001$), контроле и дозе од 8 J/cm^2 ($p<0.001$), контроле и дозе од 16 J/cm^2 ($p=0.002$), затим између дозе од 4 J/cm^2 и дозе од 16 J/cm^2 ($p<0.001$), као и између дозе од 8 J/cm^2 и дозе од 16 J/cm^2 ($p<0.001$), али није статистички значајна између дозе од 4 J/cm^2 и дозе од 8 J/cm^2 ($p=0.915$).

Коначни резултати овог експеримента показују да при деловању доза од 4 J/cm^2 и 8 J/cm^2 , *HeLa* ћелије показују већу способност редукције МТТ у односу на нетретиране ћелије, што значи да је овакав третман довео до већег раста ћелија у култури и/или њиховог метаболизма зависног од митохондрија. У односу на претходно описани експеримент, обе дозе показују јачи стимулаторни ефекат на *HeLa* ћелије. Највећа примењена доза од 16 J/cm^2 је деловала благо инхибиторно на *HeLa* ћелије, слично као и у претходно описаном експерименту, али са израженијим инхибиторним ефектом.

6.1.2. Резултати микроскопске анализе раста и вијабилности *HeLa* ћелија

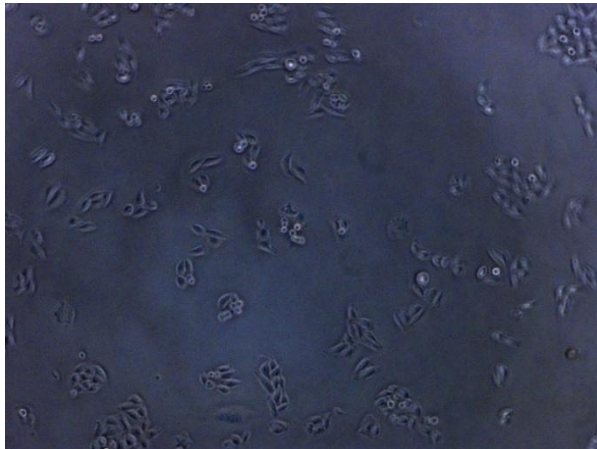
Процена густине и епителне организације *HeLa* ћелијске културе под утицајем ласерског зрачења извршена је светлосно микроскопском анализом на фазном контрасту инвертног микроскопа.. Раст и организација ћелија сагледавана је у односу на контролне културе ћелија.

6.1.2.1. Резултати микроскопске анализе раста и вијабилности *HeLa* ћелија након 24 h

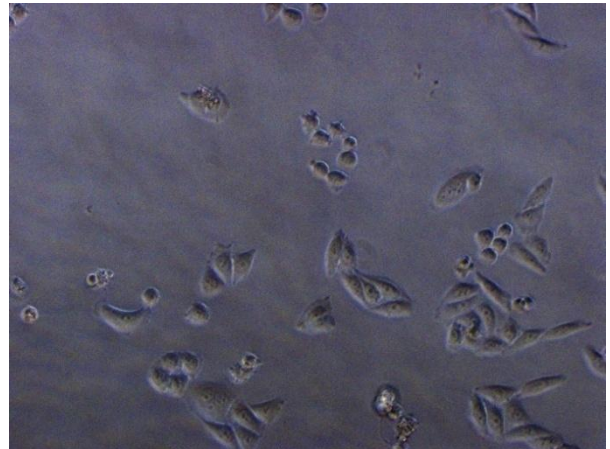
-Зрачење кроз култивациони медијум

Након 24 часа од зрачења извршена је процена густине и епителне организације *HeLa* ћелија у контролној култури, као и при деловању свих доза зрачења.

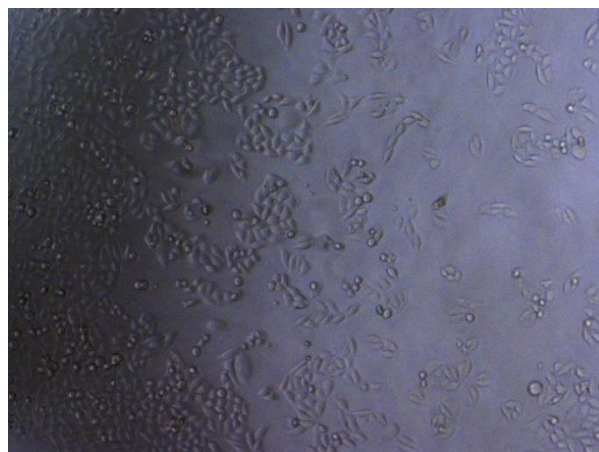
У контроли се виде мале колоније ћелија епителног, делимично вретенастог и полигоналног облика, што је карактеристика *HeLa* ћелија у младој култури (слике 12 и 13). На периферији бунарчића ћелије су густе и дају изглед епителне плоче са малим бројем заокружљених ћелија у површинском слоју (слика 14).



Слика 12. Контролна култура након 24 h.
Изглед ћелија у централном делу
бунарчића x10.

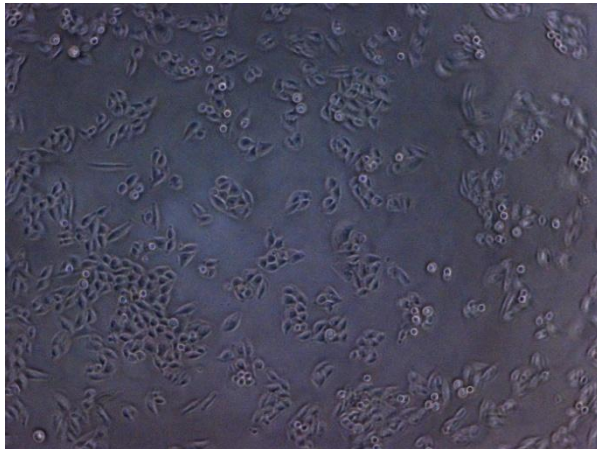


Слика 13. Контролна култура након 24 h.
Детаљ из централног дела бунарчића x20.

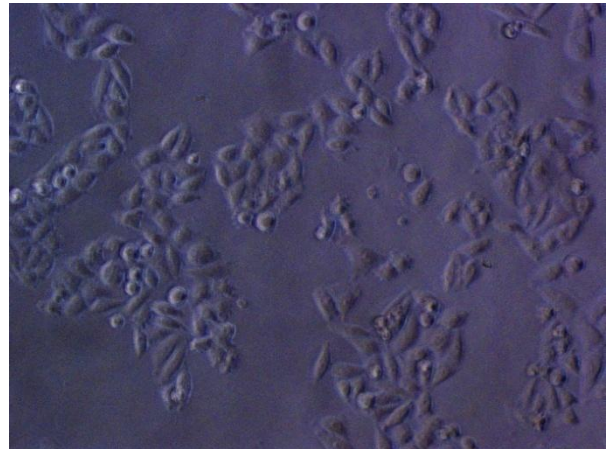


Слика 14. Контролна култура након 24 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића
x10.

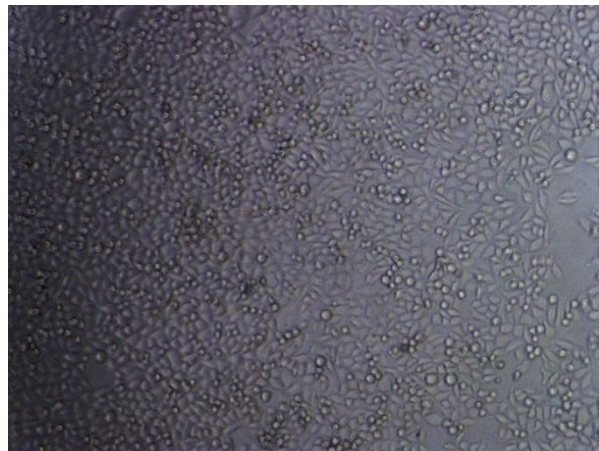
Код зрачења у дози од 4 J/cm^2 , након 24 часа, микроскопска анализа показује да је у централном делу бунарчића већа густина ћелија у односу на контролу, са неколицином округлих ћелија у слоју изнад адхерираних (слике 15 и 16). У периферном делу бунарчића види се већа густина ћелија које су ситније и већи број заокружених ћелија међу којима има очигледно апоптотичних (слика 17).



Слика 15. Култура под дејством дозе 4 J/cm^2 након 24 h. Изглед ћелија у централном делу бунарчића $\times 10$.

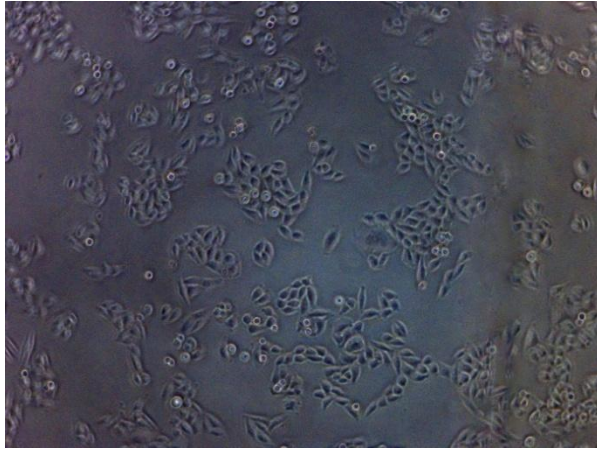


Слика 16. Култура под дејством дозе 4 J/cm^2 након 24 h. Детаљ из централног дела бунарчића $\times 20$.

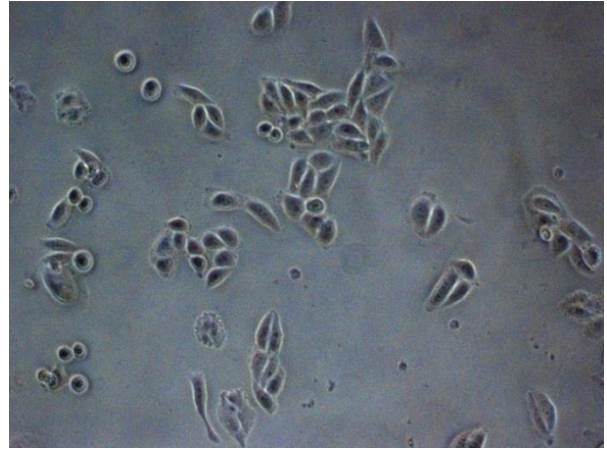


Слика 17. Култура под дејством дозе 4 J/cm^2 након 24 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића $\times 10$.

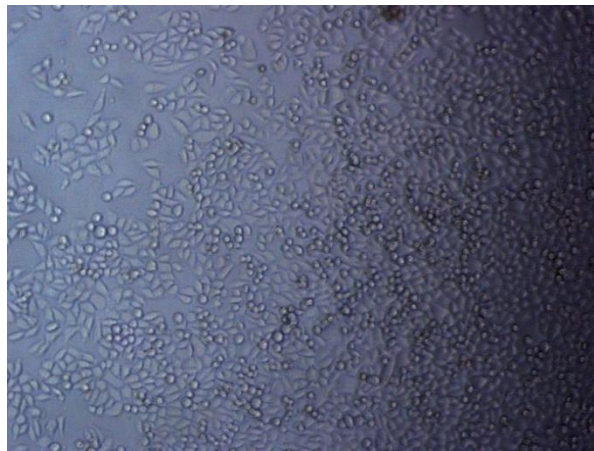
Код зрачења у дози од 8 J/cm^2 у централном делу бунарчића већа је густина углавном ситнијих ћелија а мањи број заокругљених ћелија на површини (слике 18 и 19). На периферији бунарчића види се већа густина ћелија у односу на контролу као и већа полиморфност ћелија (слика 20).



Слика 18. Култура под дејством дозе 8 J/cm^2 након 24 h. Изглед ћелија у централном делу бунарчића $\times 10$.

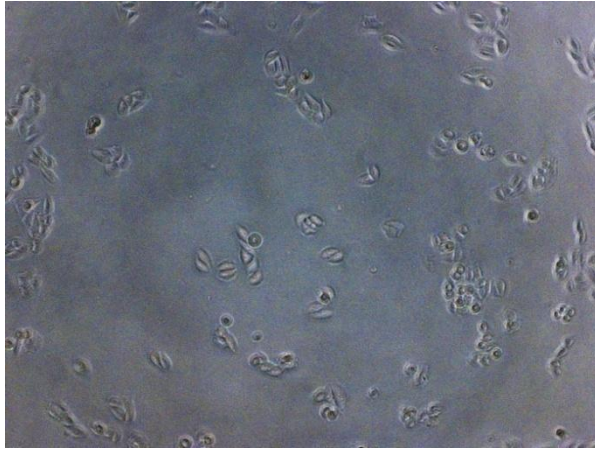


Слика 19. Култура под дејством дозе 8 J/cm^2 након 24 h. Детаљ из централног дела бунарчића $\times 20$. Ћелије у деоби са широким ламелоподијама и у кретању.

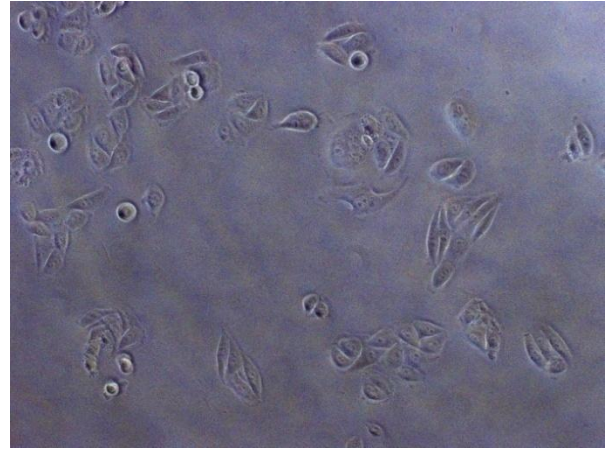


Слика 20. Култура под дејством дозе 8 J/cm^2 након 24 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића $\times 10$.

Код зрачења у дози од 16 J/cm^2 у средишњем делу бунарчића присутне су ретке ћелије, много ређе у односу на контролу. Ћелије су ситније и има доста заокружених и са знаковима апоптозе (слике 21 и 22). На периферији је присутно доста заокружених ћелија са знаковима апоптозе и присутна је ћелијска плеоморфност (слика 23).



Слика 21. Култура под дејством дозе 16 J/cm^2 након 24 h. Изглед ћелија у централном делу бунарчића $\times 10$.



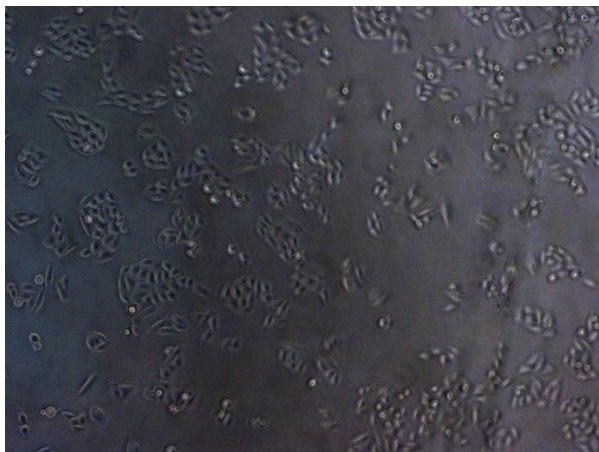
Слика 22. Култура под дејством дозе 16 J/cm^2 након 24 h. Детаљ из централног дела бунарчића $\times 20$.



Слика 23. Култура под дејством дозе 16 J/cm^2 након 24 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића $\times 10$.

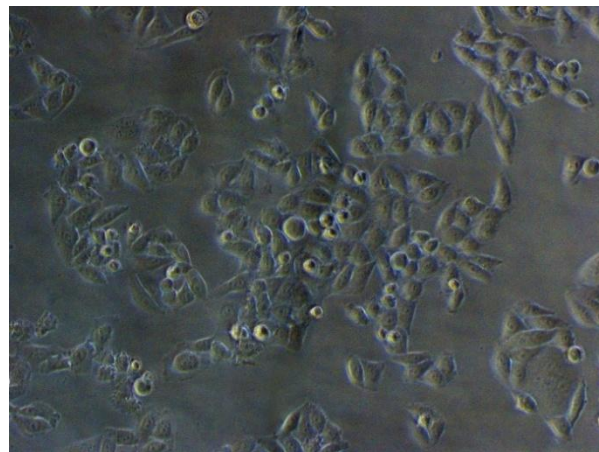
-Зрачење кроз дно култивационе плоче

Након 24 h раста незрачених ћелија, које су биле контрола, види се почетак формирања културе у облику плоча епителног изгледа (слике 24-26).



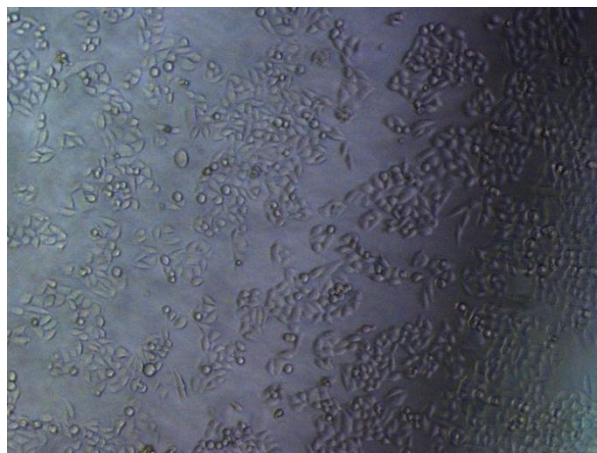
Слика 24. Контролна култура након 24 h.

Изглед ћелија у централном делу
бунарчића x10.



Слика 25. Контролна култура након 24 h.

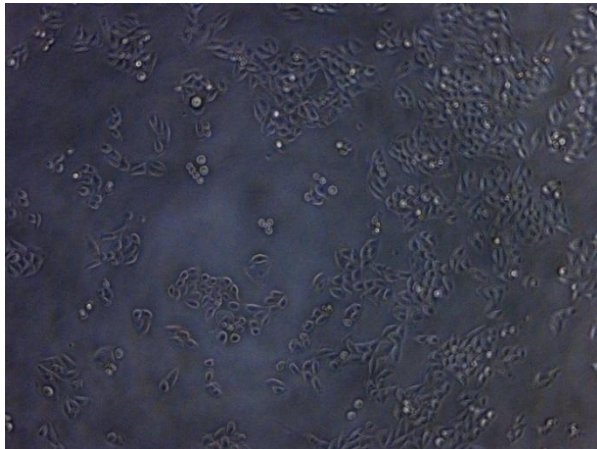
Детаљ из централног дела бунарчића x20.



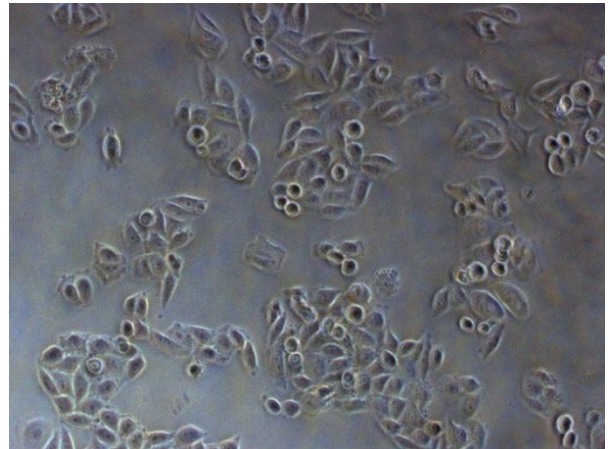
Слика 26. Контролна култура након 24 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића

x10.

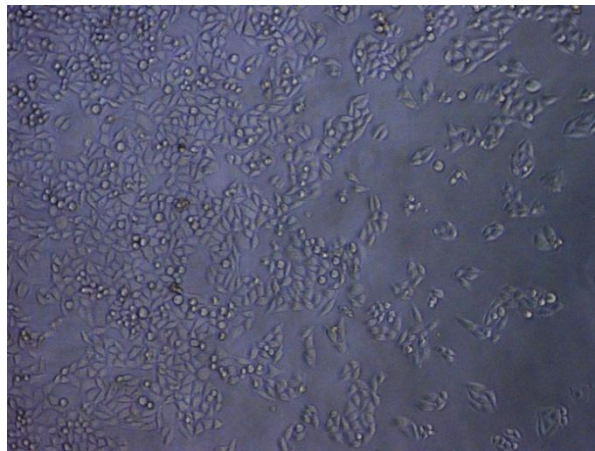
Код зрачења у дози од 4 J/cm^2 , након 24 часа, види се у централном делу бунарчића већа густина него у контроли, а присутне су и ћелије у другом слоју, као и заокружљене ћелије, што може бити знак апоптозе, али и деобне активности (слике 27 и 28). У периферном делу бунарчића присутна је већа густина ћелија у односу на контролу, а приметно је и присуство ћелија у другом слоју које су вероватно у апоптози (слика 29).



Слика 27. Култура под дејством дозе 4 J/cm^2 након 24 h. Изглед ћелија у централном делу бунарчића $\times 10$.

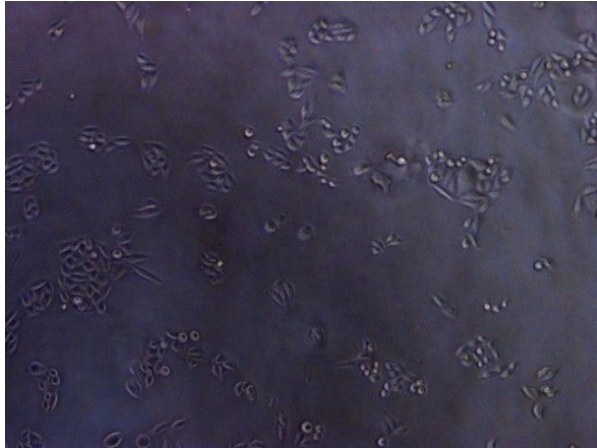


Слика 28. Култура под дејством дозе 4 J/cm^2 након 24 h. Детаљ из централног дела бунарчића $\times 20$.

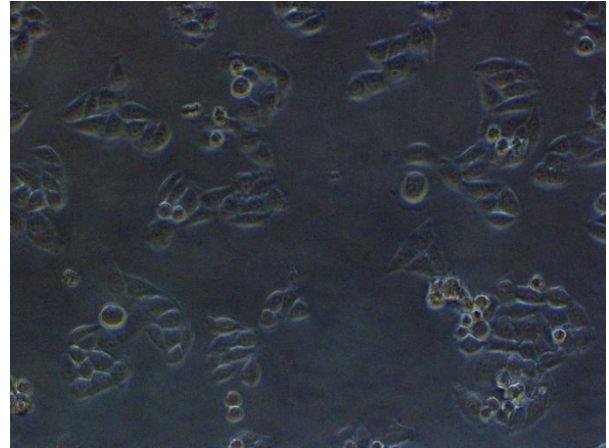


Слика 29. Култура под дејством дозе 4 J/cm^2 након 24 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића $\times 10$.

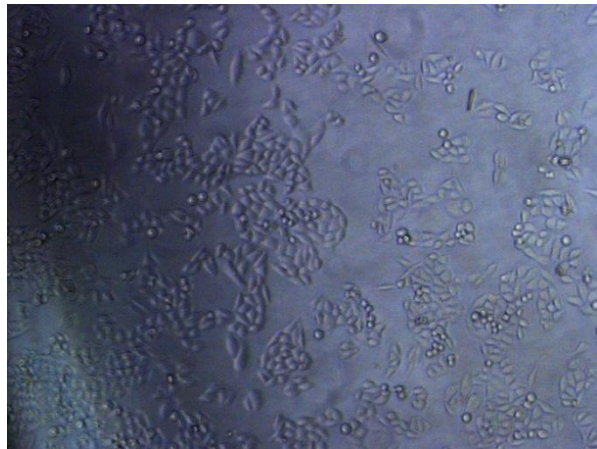
Код зрачења у дози од 8 J/cm^2 у централном делу бунарчића види се већа густина ћелија у односу на контролу, али нешто мања у односу на 4 J/cm^2 (слике 30 и 31). На периферији бунарчића види се већа густина ћелија у односу на контролу (слика 32).



Слика 30. Култура под дејством дозе 8 J/cm^2 након 24 h. Изглед ћелија у централном делу бунарчића $\times 10$.

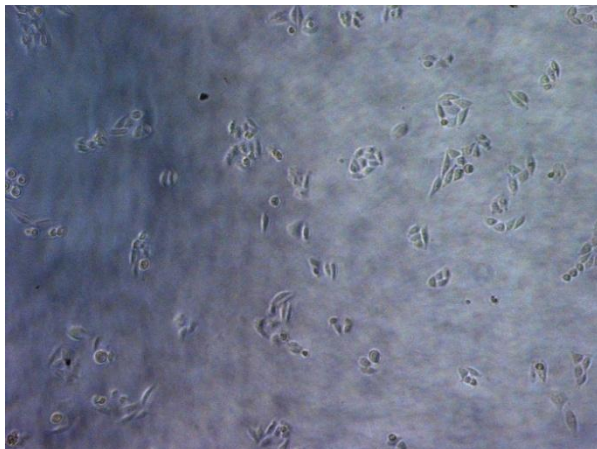


Слика 31. Култура под дејством дозе 8 J/cm^2 након 24 h. Детаљ из централног дела бунарчића $\times 20$.

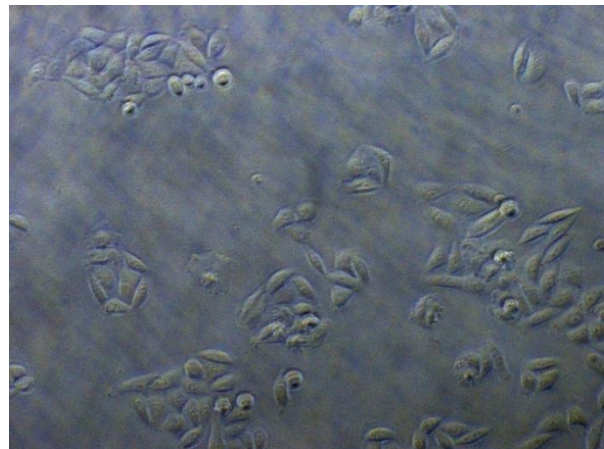


Слика 32. Култура под дејством дозе 8 J/cm^2 након 24 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића $\times 10$.

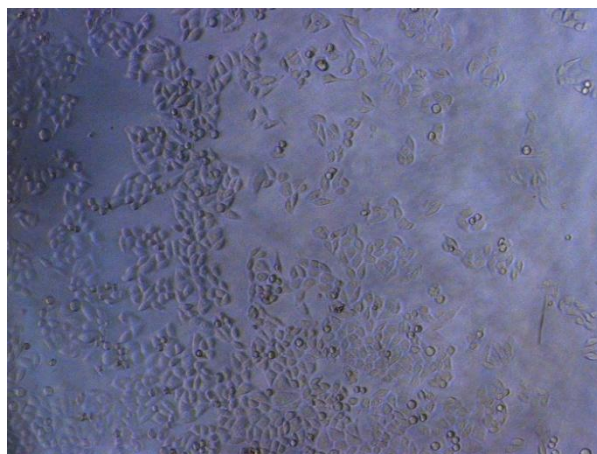
Код зрачења у дози од 16 J/cm^2 у средишњем делу бунарчића присутна је мала густина ћелија које нису организоване у епителне скупине. Ћелије су различитог облика и има доста заокругљених, издужених, фибробластоидних и појединачних (слике 33 и 34). На периферији је присутна већа полиморфност ћелија, присутне су и врло крупне и врло ситне ћелије, велика хетерогеност ћелија и доста ћелија са знаковима апоптозе (слика 35).



Слика 33. Култура под дејством дозе 16 J/cm^2 након 24 h. Изглед ћелија у централном делу бунарчића $\times 10$.



Слика 34. Култура под дејством дозе 16 J/cm^2 након 24 h. Детаљ из централног дела бунарчића $\times 20$.

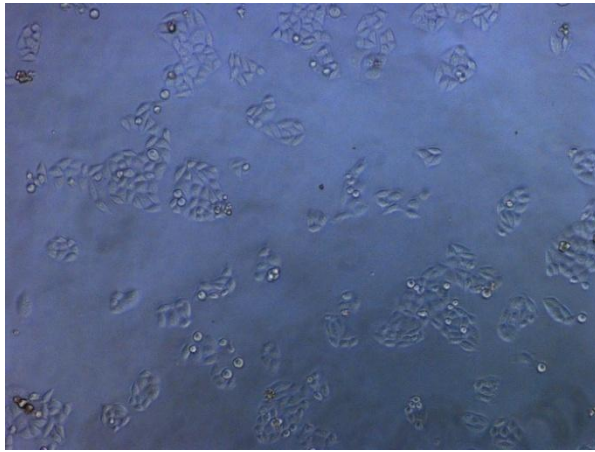


Слика 35. Култура под дејством дозе 16 J/cm^2 након 24 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића $\times 10$.

6.1.2.2. Резултати микроскопске анализе раста и вијабилности *HeLa* ћелија након 48 h

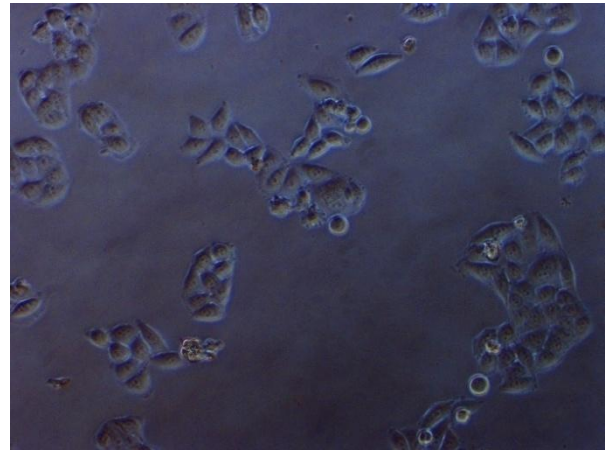
-Зрачење кроз култивациони медијум

Након 48 h од раста ћелија у контролној култури се у средишњем делу бунарчића види више великих колонија са заокругљеним ћелијама и по неком апоптотичном (слике 36 и 37). На периферији бунарчића присутна је велика густина ћелија са доста округлих ћелија и по неком апоптотичном. Доминира епителни облик ћелија (слика 38).



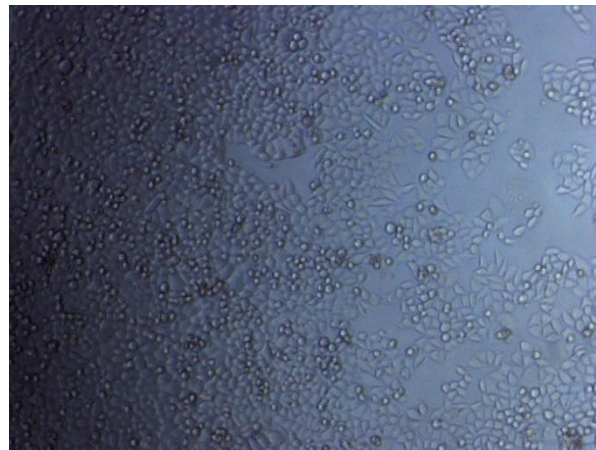
Слика 36. Контролна култура након 48 h.

Изглед ћелија у централном делу
бунарчића x10.



Слика 37. Контролна култура након 48 h.

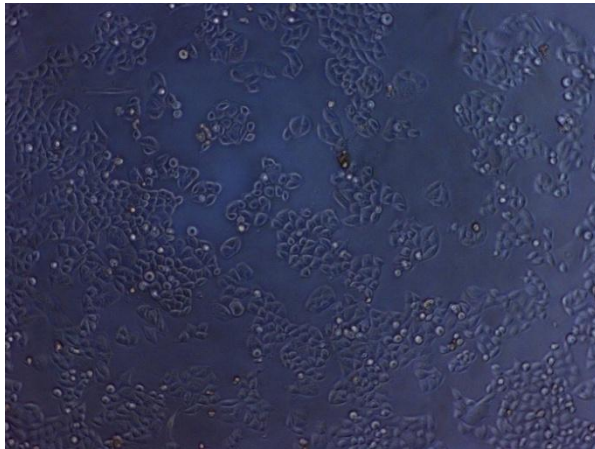
Детаљ из централног дела бунарчића x20.



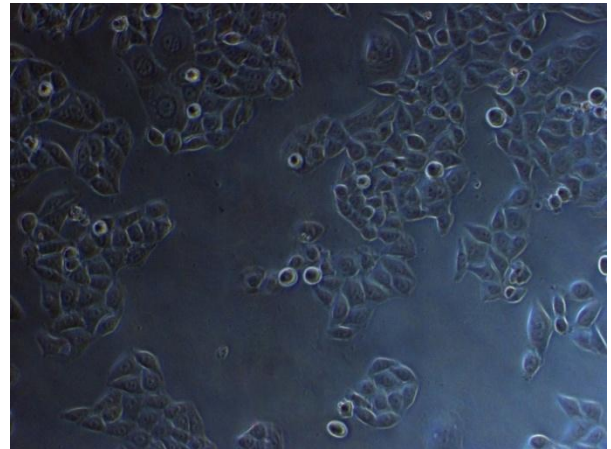
Слика 38. Контролна култура након 48 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића

x10.

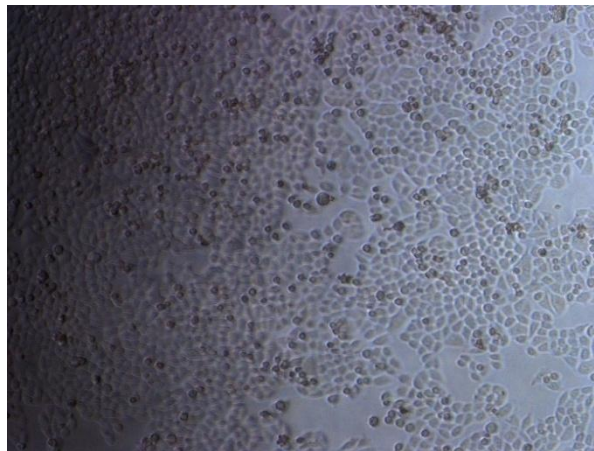
Код зрачења у дози од 4 J/cm^2 , након 48h, микроскопска анализа показује да је у централном делу бунарчића већа густина него у контроли али су ћелије ситније, округлије и на више места уочљива је митоза. Присутан је и већи број апоптотичних ћелија у односу на контролу као и већа хетерогеност ћелија (слике 39 и 40). Периферна густина је слична као у контроли али са нешто више апоптозе (слика 41).



Слика 39. Култура под дејством дозе 4 J/cm^2 након 48 h. Изглед ћелија у централном делу бунарчића $\times 10$.

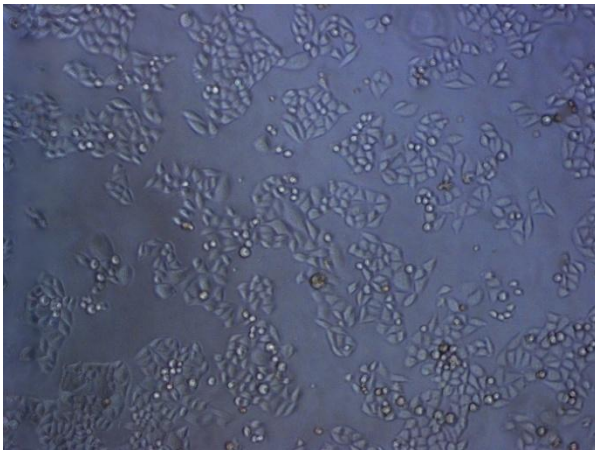


Слика 40. Култура под дејством дозе 4 J/cm^2 након 48 h. Детаљ из централног дела бунарчића $\times 20$.

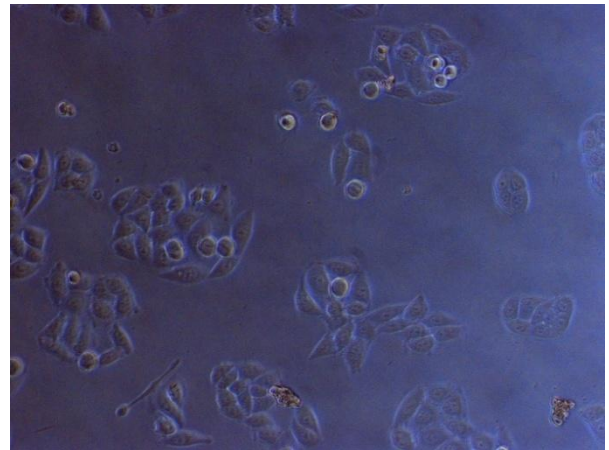


Слика 41. Култура под дејством дозе 4 J/cm^2 након 48 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића $\times 10$.

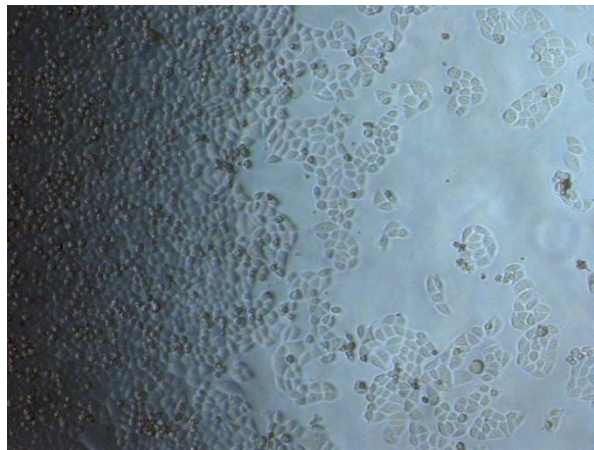
Код зарачења у дози од 8 J/cm^2 , 48 h након третмана, у централном делу бунарчића густина ћелија је већа него код контроле, ћелије су изузетно полиморфне. Има доста и врло курупних и врло ситних иако већина има нормалан епителни полигонални облик. Присутан је мањи број заокругљених ћелија као и апоптотичних (слике 42 и 43). На периферији бунарчића изглед ћелија је као и у централном делу али је густина већа (слика 44).



Слика 42. Култура под дејством дозе 8 J/cm^2 након 48 h. Изглед ћелија у централном делу бунарчића x10.

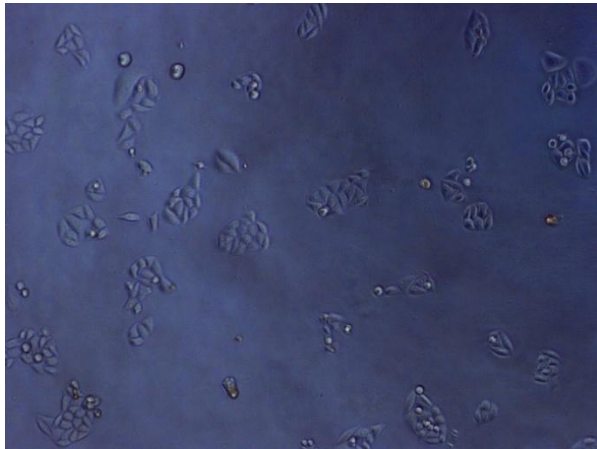


Слика 43. Култура под дејством дозе 8 J/cm^2 након 48 h. Детаљ из централног дела бунарчића x20.

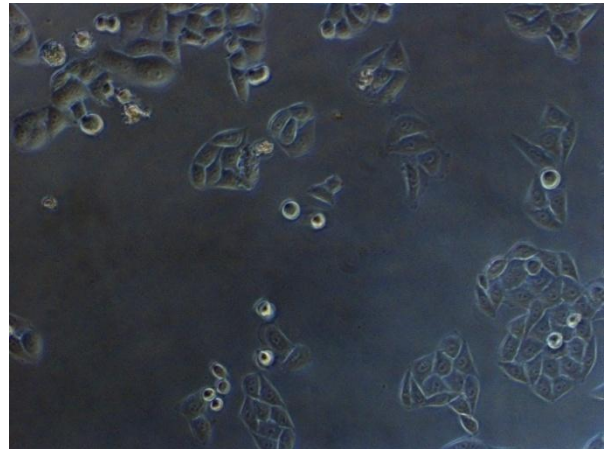


Слика 44. Култура под дејством дозе 8 J/cm^2 након 48 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића x10.

Код зрачења у дози од 16 J/cm^2 види се најмања густина у односу на све друге посматране групе културе са ћелијама у апоптози (слике 45 и 46). На периферији је присутан велики број ситних округлих ћелија у слоју изнад адхерираних са уочљивом апоптозом на више места (слика 47).



Слика 45. Култура под дејством дозе 16 J/cm^2 након 48 h. Изглед ћелија у централном делу бунарчића $\times 10$.



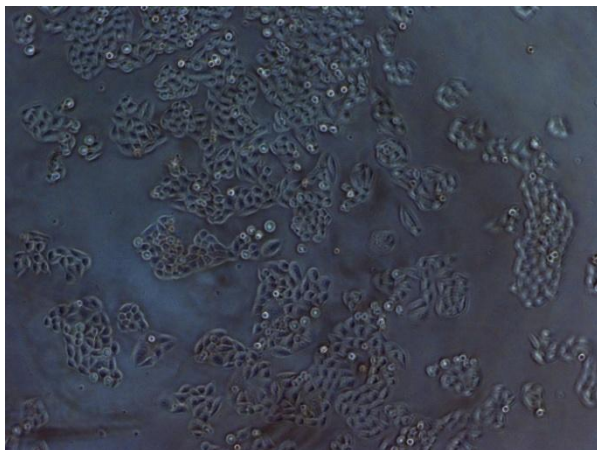
Слика 46. Култура под дејством дозе 16 J/cm^2 након 48 h. Детаљ из централног дела бунарчића $\times 20$.



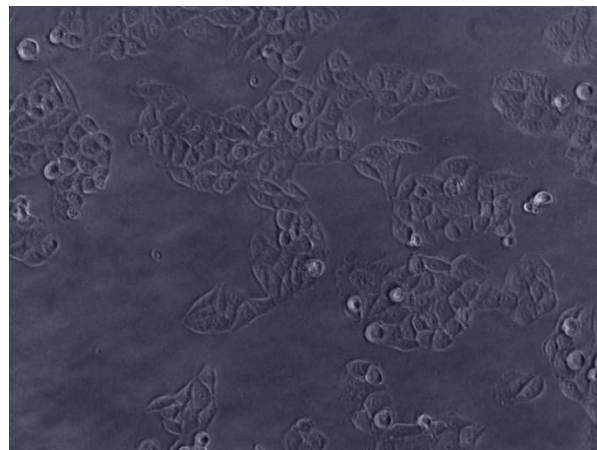
Слика 47. Култура под дејством дозе 16 J/cm^2 након 48 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића $\times 10$.

-Зрачење кроз дно култивационе плоче

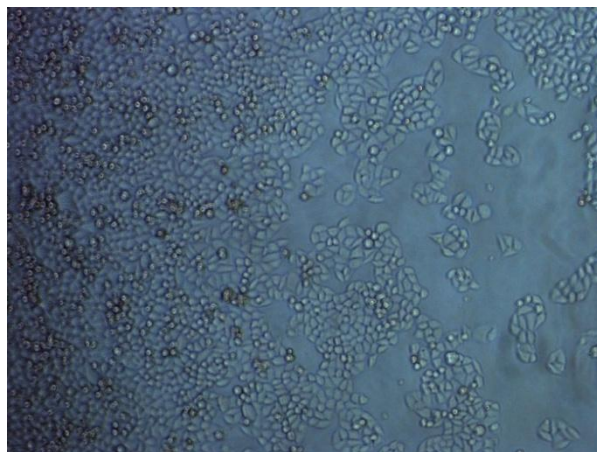
Након 48 h од раста контролне културе у средишњем делу бунарчића види око 50% покривености површине са типичним епителним растом (слике 48 и 49). На периферији бунарчића култивационе плоче види се да је постигнута конфлуентност што може бити један од разлога присутне апоптозе (слика 50).



Слика 48. Контролна култура након 48 h.
Изглед ћелија у централном делу
бунарчића x10.

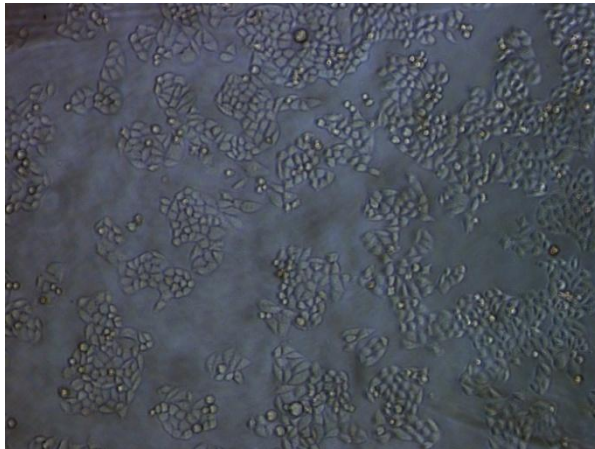


Слика 49. Контролна култура након 48 h.
Детаљ из централног дела бунарчића x20.



Слика 50. Контролна култура након 48 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића
x10.

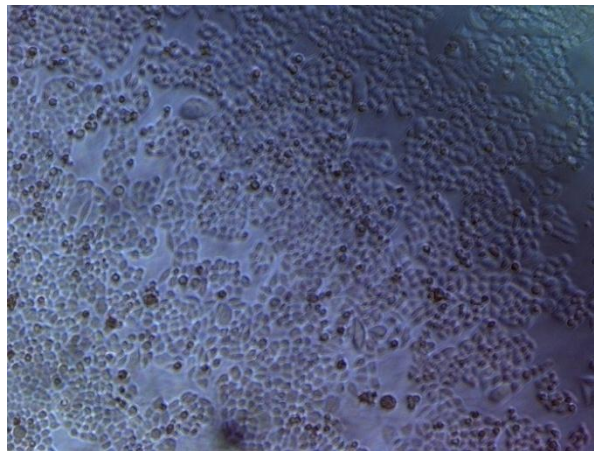
Код зрачења у дози од 4 J/cm^2 , након 48h, микроскопска анализа показује да је у централном делу бунарчића слична или нешто већа густина него у контроли и да има више округлих ћелија које су знак деобне активности (слике 51 и 52). На периферији бунарчића види се велика густина и плеоморфност ћелија, ћелије различитог облика, као и ћелије у апоптози (слика 53).



Слика 51. Култура под дејством дозе 4 J/cm^2 након 48 h. Изглед ћелија у централном делу бунарчића $\times 10$.

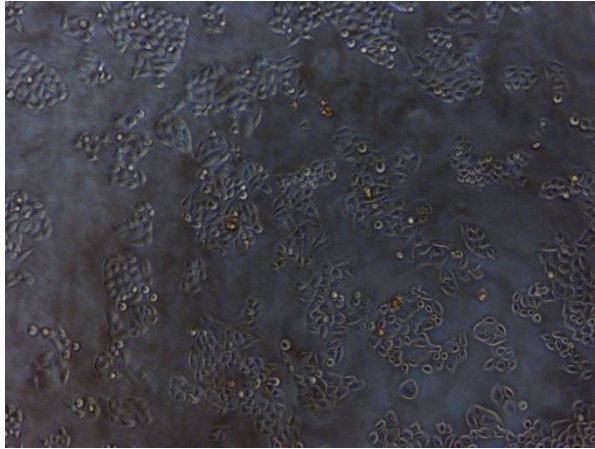


Слика 52. Култура под дејством дозе 4 J/cm^2 након 48 h. Детаљ из централног дела бунарчића $\times 20$.

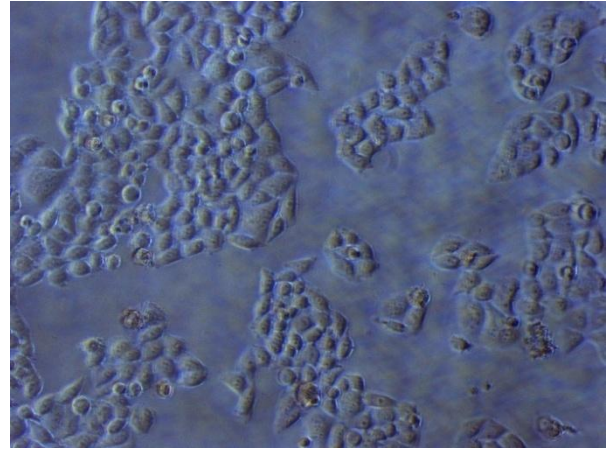


Слика 53. Култура под дејством дозе 4 J/cm^2 након 48 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића $\times 10$.

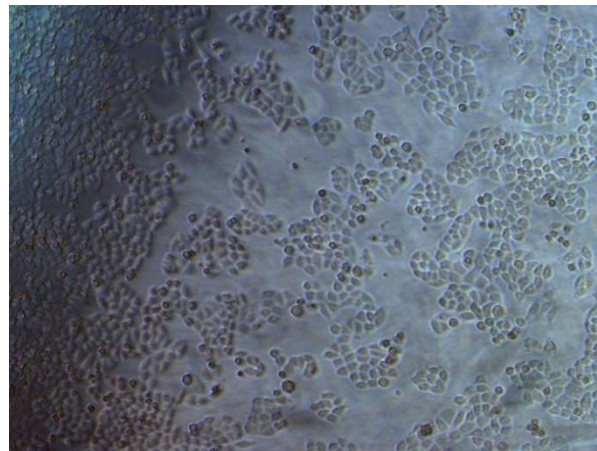
Код зрачења у дози од 8 J/cm^2 , 48 h након третмана, у централном делу бунарчића присутно је више апоптотичних ћелија у односу на дозу од 4 J/cm^2 (слике 54 и 55). На периферији бунарчића присутна је слична али нешто мања густина него при дејству 4 J/cm^2 (слика 56).



Слика 54. Култура под дејством дозе 8 J/cm^2 након 48 h. Изглед ћелија у централном делу бунарчића x10.

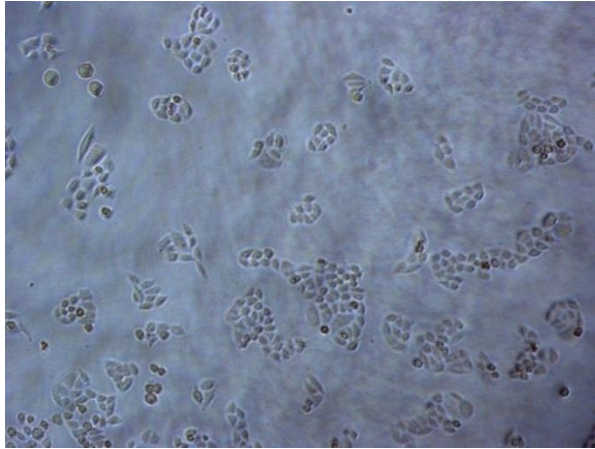


Слика 55. Култура под дејством дозе 8 J/cm^2 након 48 h. Детаљ из централног дела бунарчића x20.

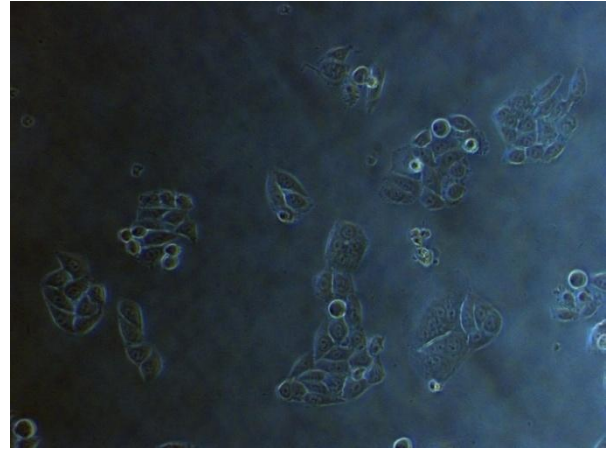


Слика 56. Култура под дејством дозе 8 J/cm^2 након 48 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића x10.

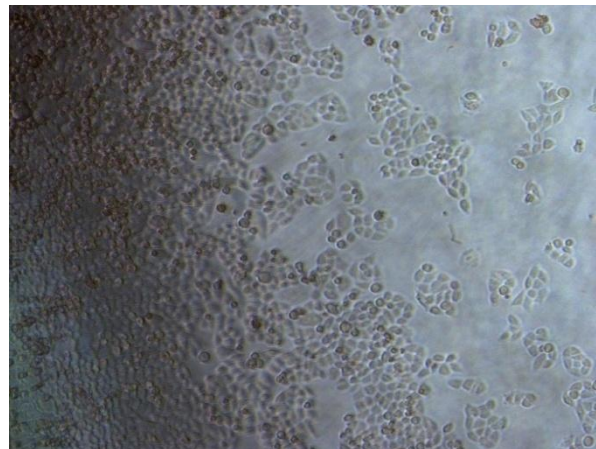
Код зрачења у дози од $16\text{J}/\text{cm}^2$ у централном делу бунарчића види се најмања густина у односу на остале дозе и контролу. Присутна је апоптоза ћелија, плеоморфност, са изразито ситним и изразито крупним ћелијама различитог облика (слике 57 и 58). У периферном делу бунарчића види се пуно ћелија у апоптози (слика 59).



Слика 57. Култура под дејством дозе $16\text{J}/\text{cm}^2$ након 48 h. Изглед ћелија у централном делу бунарчића $\times 10$.



Слика 58. Култура под дејством дозе $16\text{J}/\text{cm}^2$ након 48 h. Детаљ из централног дела бунарчића $\times 20$.

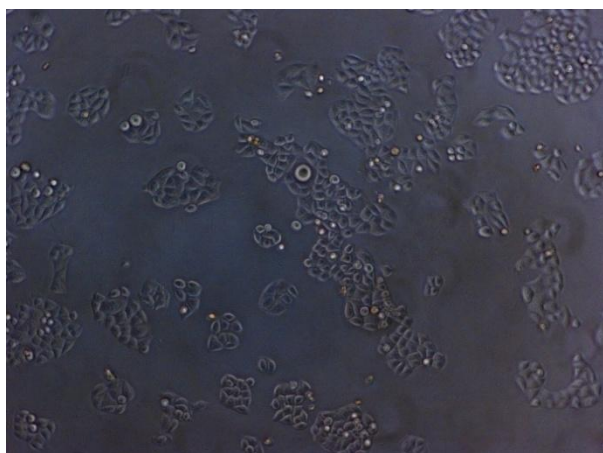


Слика 59. Култура под дејством дозе $16\text{J}/\text{cm}^2$ након 48 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића $\times 10$.

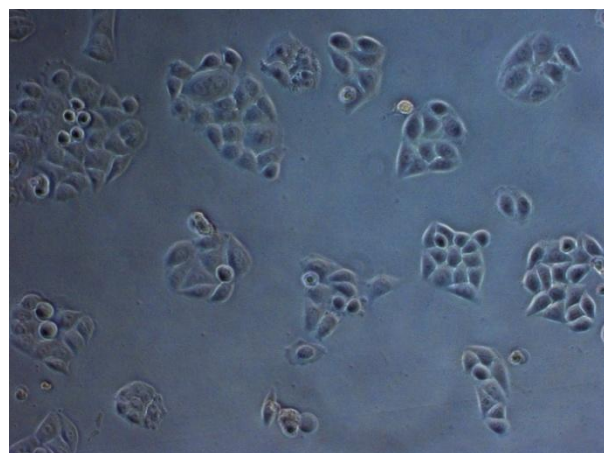
6.1.2.3. Резултати микроскопске анализе раста и вијабилности *HeLa* ћелија након 72 h

-Зрачење кроз култивациони медијум

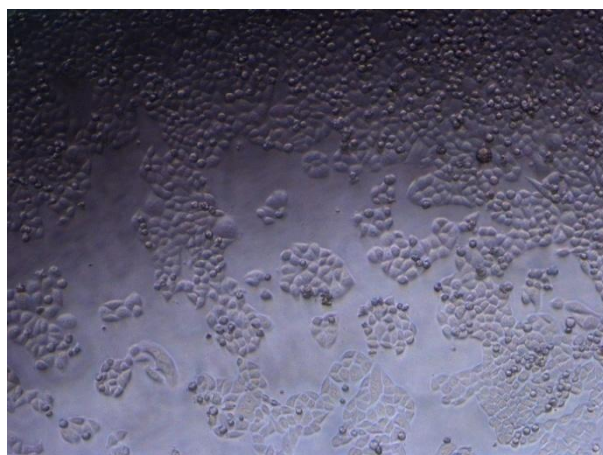
Након 72 h раста ћелија у контролној култури у средишњем делу бунарчића запажа се типичан изглед епителних *HeLa* ћелије са половичном густином, са неколицином округлих ћелија и по неком апоптотичном ћелијом (слике 60 и 61). На периферији бунарчића види се конфлуентност са ћелијама типичног епителног облика уз по неку крупну и фибробластoidну ћелију, са мањим бројем округлих ћелија и слабо присутном апоптозом (слика 62).



Слика 60. Контролна култура након 72 h.
Изглед ћелија у централном делу
бунарчића x10.

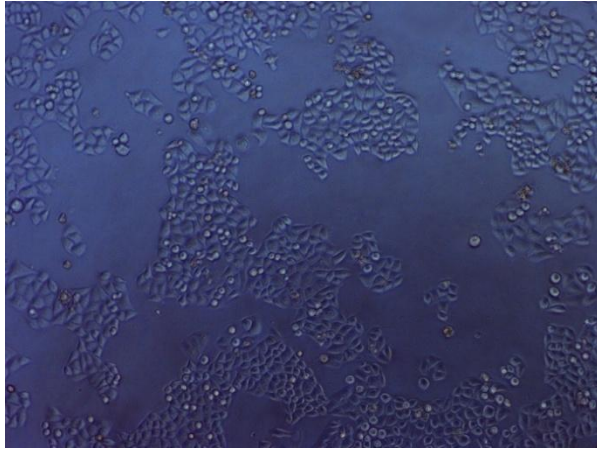


Слика 61. Контролна култура након 72 h.
Детаљ из централног дела бунарчића x20.

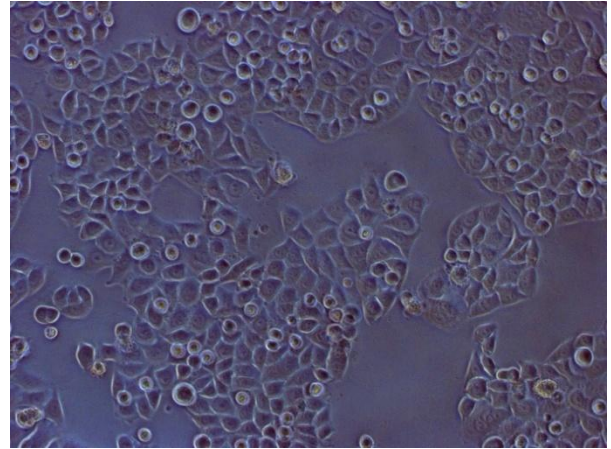


Слика 62. Контролна култура након 72 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића
x10.

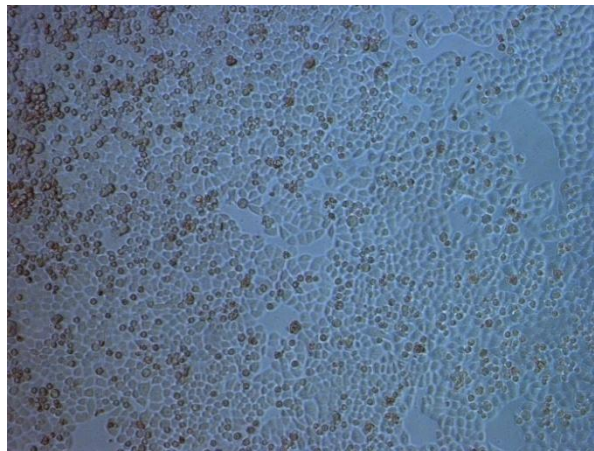
Код зрачења у дози од 4 J/cm^2 , након 72 часа, у централном делу бунарчића ћелије су гушће у односу на контролу, полиморфне, има крупних и ситнијих као и неуобичајених облика. Мали је број округлих и апоптотичних ћелија (слике 63 и 64). На периферији је присутно више апоптотичних ћелија (слика 65).



Слика 63. Култура под дејством дозе 4 J/cm^2 након 72 h. Изглед ћелија у централном делу бунарчића $\times 10$.

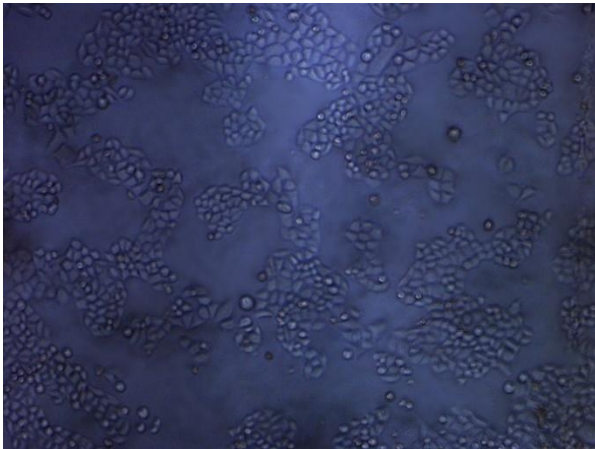


Слике 64. Култура под дејством дозе 4 J/cm^2 након 72 h. Детаљ из централног дела бунарчића $\times 20$.

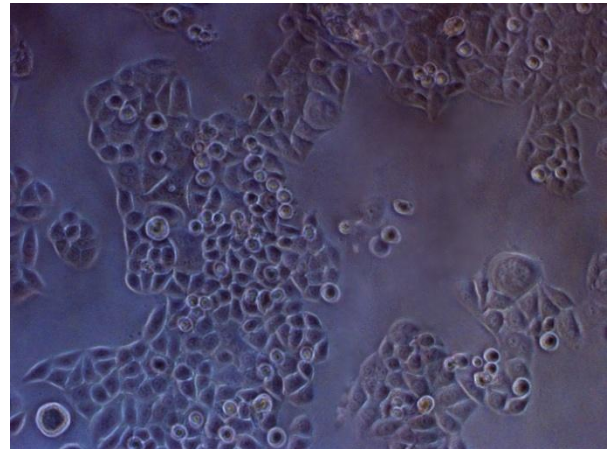


Слика 65. Култура под дејством дозе 4 J/cm^2 након 72 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића $\times 10$.

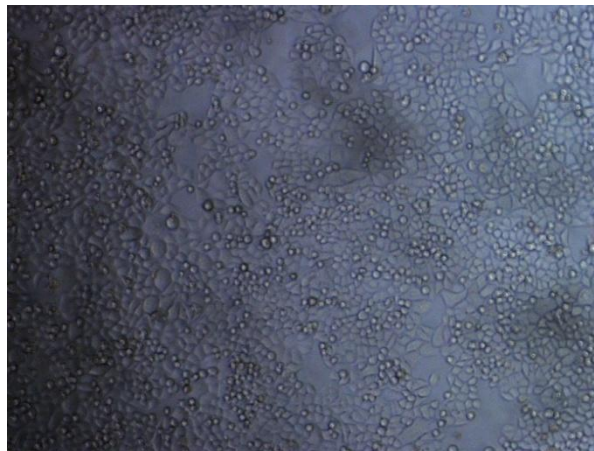
Код зарачења у дози од 8 J/cm^2 , 72h након третмана, у централном делу бунарчића запажа се слична ситуација као код дозе од 4 J/cm^2 само са већом густином ћелија (слике 66 и 67). На периферији се види велика густина и велика полиморфност ћелија. Велики је број крупних и ситних ћелија, као и округлих, али је број апоптотичних у односу на густину релативно мали (слика 68).



Слика 66. Култура под дејством дозе 8 J/cm^2 након 72 h. Изглед ћелија у централном делу бунарчића $\times 10$.

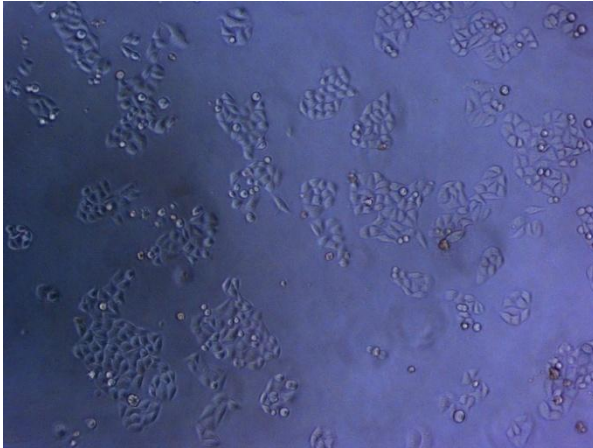


Слика 67. Култура под дејством дозе 8 J/cm^2 након 72 h. Детаљ из централног дела бунарчића $\times 20$.

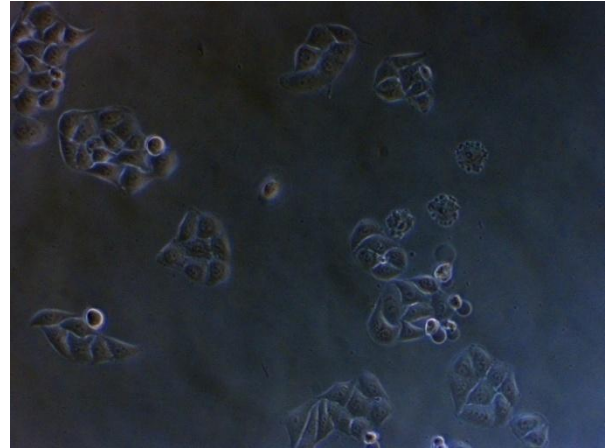


Слика 68. Култура под дејством дозе 8 J/cm^2 након 72 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића $\times 10$.

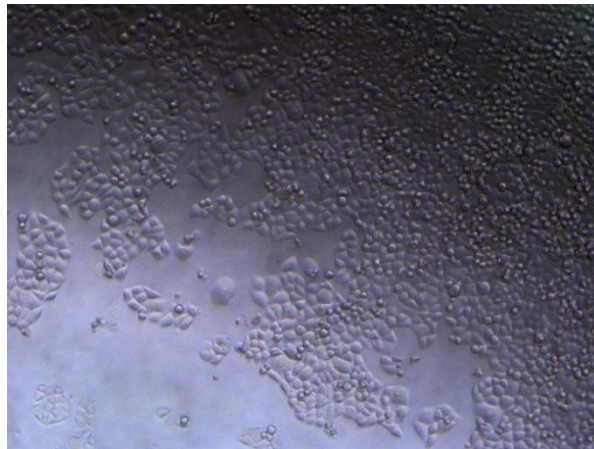
Код зрачења у дози од 16 J/cm^2 види се мања густина у односу на претходне дозе са више апоптотичних ћелија (слике 69 и 70). На периферији је присутан мањи број ћелија, од тога више округлих и више апоптотичних (слика 71).



Слика 69. Култура под дејством дозе 16 J/cm^2 након 72 h. Изглед ћелија у централном делу бунарчића $\times 10$.



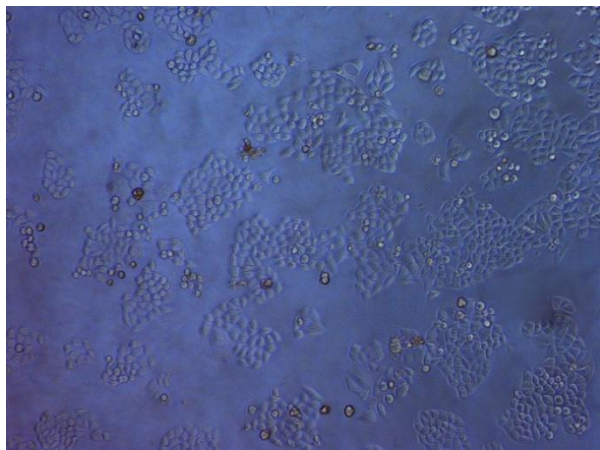
Слика 70. Култура под дејством дозе 16 J/cm^2 након 72 h. Детаљ из централног дела бунарчића $\times 20$.



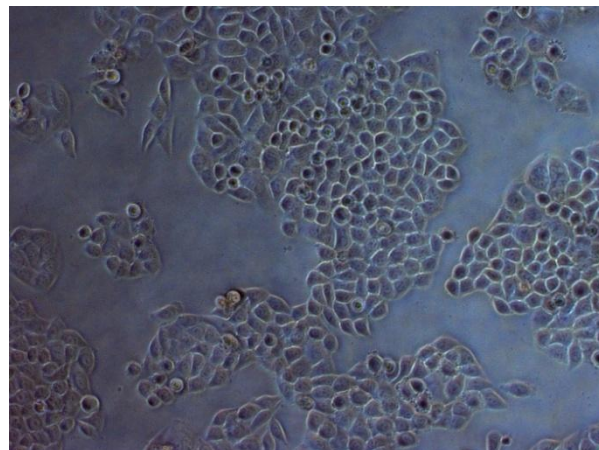
Слика 71. Култура под дејством дозе 16 J/cm^2 након 72 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића $\times 10$.

-Зрачење кроз дно култивационе плоче

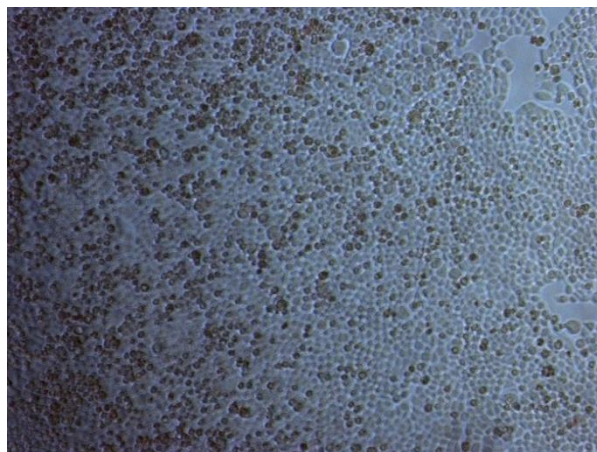
Након 72 h у контролној култури се у средишњем делу бунарчића запажа слична ситуација као и код контроле након 48 h, али са нешто већом прекривеношћу површине и нешто више апоптотичних ћелија (слике 72 и 73). На периферији бунарчића види се потпуна конфлуентност, која је праћена са великим присуством апоптозе (слика 74).



Слика 72. Контролна култура након 72 h.
Изглед ћелија у централном делу
бунарчића x10.

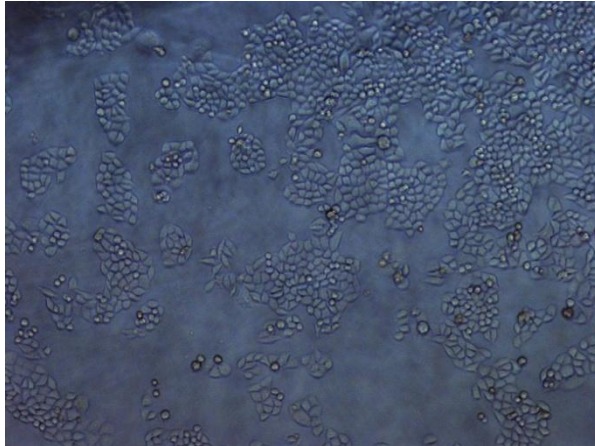


Слика 73. Контролна култура након 72 h.
Детаљ из централног дела бунарчића x20.

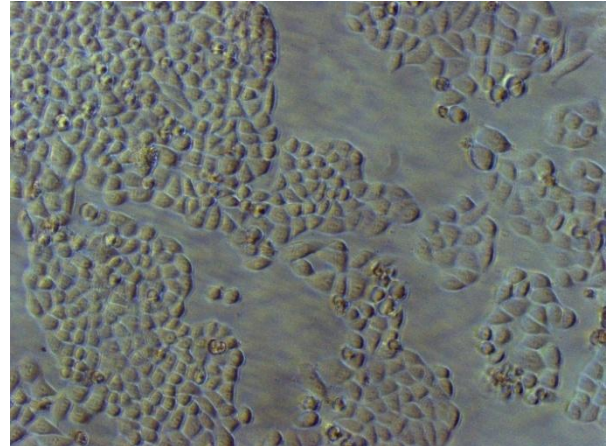


Слика 74. Контролна култура након 72 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића
x10.

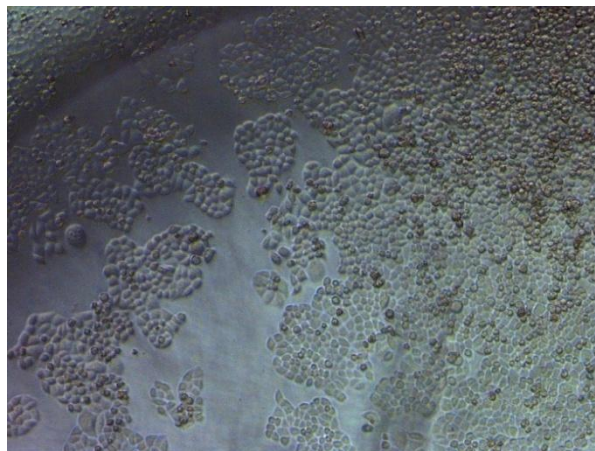
Код зрачења у дози од 4 J/cm^2 , након 72 часа, у централном делу бунарчића ћелије су гушће у односу на контролу (слике 75 и 76). На периферији бунарчића присутна је велика густина ћелија, плеоморфност ћелија, као и доста апоптотичних ћелија (слика 77).



Слика 75. Култура под дејством дозе 4 J/cm^2 након 72 h. Изглед ћелија у централном делу бунарчића $\times 10$.

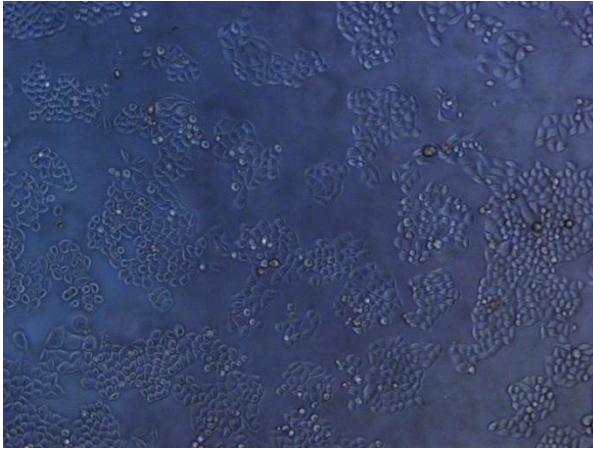


Слике 76. Култура под дејством дозе 4 J/cm^2 након 72 h. Детаљ из централног дела бунарчића $\times 20$.

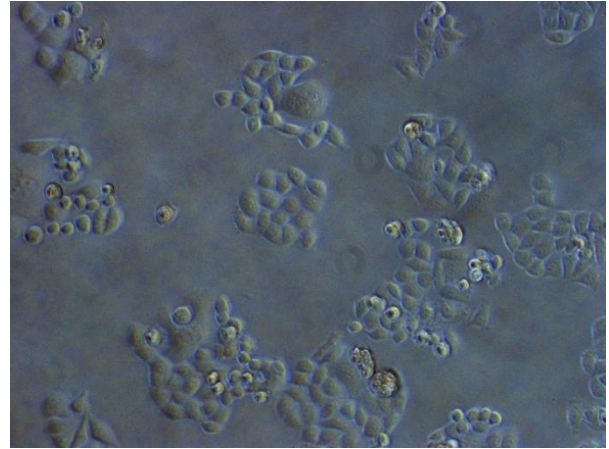


Слика 77. Култура под дејством дозе 4 J/cm^2 након 72 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића $\times 10$.

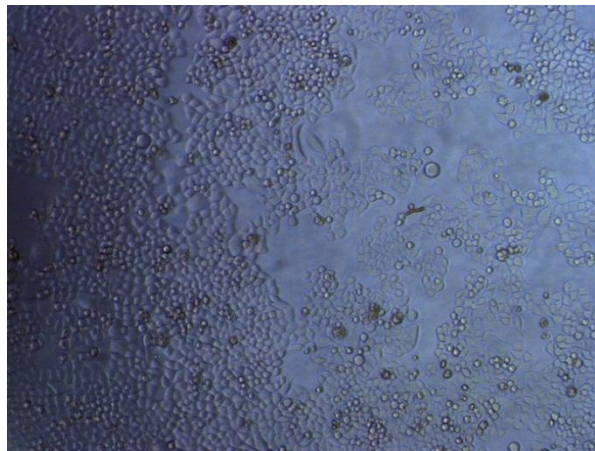
Код зрачења у дози од 8 J/cm^2 , 72 h након третмана у централном делу бунарчића запажа се већа плеоморфност ћелија, док је густина ћелија слична као код дозе од 4 J/cm^2 (слике 78 и 79). У периферном делу бунарчића присутна је већа плеоморфност, а густина је нешто мања у односу на дозу од 4 J/cm^2 (слика 80).



Слика 78. Култура под дејством дозе 8 J/cm^2 након 72 h. Изглед ћелија у централном делу бунарчића $\times 10$.

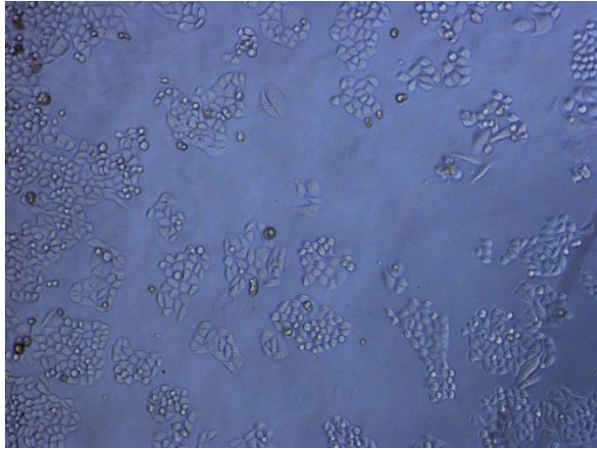


Слика 79. Култура под дејством дозе 8 J/cm^2 након 72 h. Детаљ из централног дела бунарчића $\times 20$.

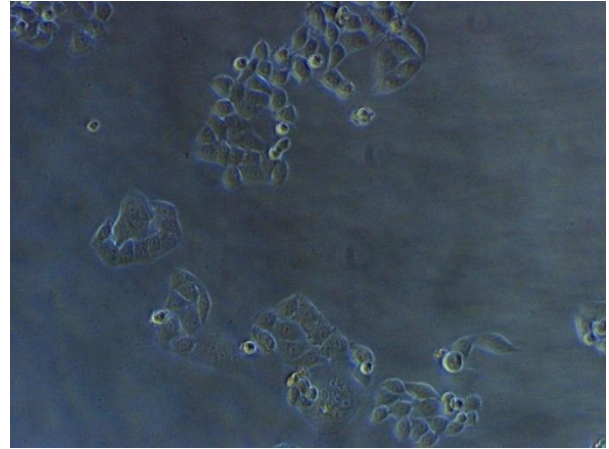


Слика 80. Култура под дејством дозе 8 J/cm^2 након 72 h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића $\times 10$.

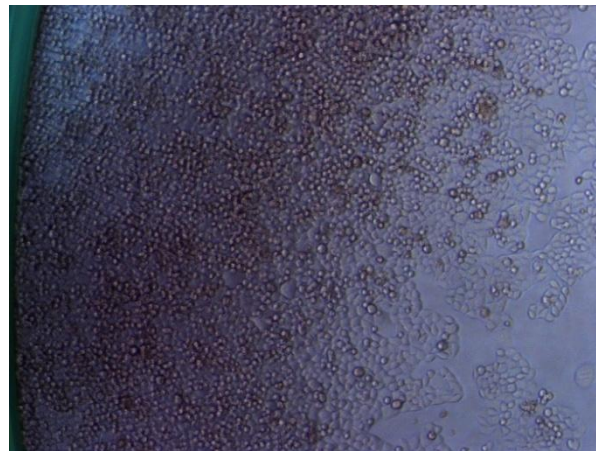
Код зрачења у дози од $16\text{J}/\text{cm}^2$ види се најмања густина у односу на претходне дозе са најизраженијом плеоморфношћу изгледа ћелија, међу којима су вретенасте, крупне, ситне ћелије и ћелије у апоптози (слике 81 и 82). На периферији се види јако пуно мртвих ћелија између којих се виде појединачне крупне ћелије (слика 83).



Слика 81. Култура под дејством дозе $16\text{J}/\text{cm}^2$ након 72 h. Изглед ћелија у централном делу бунарчића $\times 10$.



Слика 82. Култура под дејством дозе $16\text{J}/\text{cm}^2$ након 72 h. Детаљ из централног дела бунарчића $\times 20$.



Слика 83. Култура под дејством дозе $16\text{J}/\text{cm}^2$ након 72h. Изглед ћелија у периферном делу бунарчића $\times 10$.

6.2. РЕЗУЛТАТИ *IN VIVO* ИСТРАЖИВАЊА

6.2.1. Вредности телесне тежине код експерименталних животиња

Телесна тежина код експерименталних животиња мерена је укупно четири пута. У табели 5 приказане су вредности телесне тежине здравих животиња и животиња са индукованим дијабетесом у време I, II и III мерења.

Табела 5. Телесна тежина здравих животиња и животиња са индукованим дијабетесом у време I, II и III мерења

Телесна тежина	Група	Број	\bar{x}	SD	Med	Min	Max
I мерење	Здрави	54	300.7	24.3	305.0	260.0	330.0
	ДМ	54	306.9	22.6	310.0	260.0	330.0
	Укупно	108	303.8	23.6	310.0	260.0	330.0
II мерење	Здрави	54	319.6	24.4	320.0	270.0	360.0
	ДМ	54	287.2	34.8	280.0	220.0	380.0
	Укупно	108	303.4	34.0	300.0	220.0	380.0
III мерење	Здрави	54	444.1	35.4	450.0	360.0	510.0
	ДМ	54	272.2	51.8	265.0	180.0	410.0
	Укупно	108	358.1	97.0	380.0	180.0	510.0

\bar{x} - Аритметичка средина, SD - Стандардна девијација, Med - Медијана

ДМ- дијабетес мелитус

I мерење - пре давања алоксана;

II мерење - 72 h након давања алоксана;

III мерење - 4 недеље након алоксана (пре почетка другог дела експеримента)

Код првог мерења телесне тежине животиња, пре давања алоксана, аритметичка средина телесне тежине здравих животиња износи 300.7 ± 24.3 g, а животиња којима је касније индукован дијабетес 306.9 ± 22.6 g. Између здравих и животиња којима је касније индукован дијабетес не постоји статистички значајна разлика у телесној тежини ($t=1.354$, $DF=106$, $p=0.179$). Код другог мерења телесне тежине експерименталних животиња, 72 h након давања алоксана, аритметичка средина телесне тежине здравих животиња износи 319.6 ± 24.4 g, а животиња са индукованим дијабетесом 287.2 ± 34.8 g. Између здравих и

животиња са дијабетесом постоји статистички значајна разлика у телесној тежини ($t=5.605$, $DF=106$, $p<0.001$).

Код трећег мерења телесне тежине експерименталних животиња, четири недеље након давања алоксана, аритметичка средина телесне тежине здравих животиња износи 444.1 ± 35.4 g, а животиња са индукованим дијабетесом 272.2 ± 51.8 g. Између здравих и животиња са дијабетесом постоји статистички значајна разлика у телесној тежини ($t=20.137$, $DF=106$, $p<0.001$).

У табелама 6, 7 и 8 приказане су вредности телесне тежине животиња мерене четири недеље након индуковања дијабетеса (треће мерење) и на дан жртвовања (четврто мерење).

Вредности телесне тежине између трећег и четвртог мерења, односно на почетку другог дела експеримента (четири недеље након индуковања дијабетеса и прављења улцерације) и на трећи дан жртвовања приказане су у табели 6.

Табела 6. Телесна тежина експерименталних животиња мерена четири недеље након индуковања дијабетеса и трећег дана

Група животиња	Број	Време мерења						p
		После четири недеље			Трећи дан			
		$\bar{x} \pm SD$	Med	Min-Max	$\bar{x} \pm SD$	Med	Min-Max	
I група	6	450.0±35.2	445.0	400.0-490.0	480.0±31.5	485.0	430.0-520.0	<0.001*
II група	6	466.7±19.7	470.0	440.0-490.0	473.3±19.7	470.0	450.0-500.0	0.175
III група	6	458.3±39.7	460.0	400.0-510.0	463.3±48.4	475.0	400.0-520.0	0.415
IV група	6	290.0±40.0	285.0	240.0-350.0	273.3±43.7	265.0	210.0-340.0	0.011*
V група	6	245.0±56.0	240.0	180.0-320.0	240.0±46.0	235.0	190.0-300.0	0.296
VI група	6	276.7±41.8	265.0	250.0-360.0	268.3±37.1	260.0	230.0-340.0	0.141

\bar{x} - Аритметичка средина, SD - Стандардна девијација, Med - Медијана, *статистичка значајност

I група - здраве животиње

II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

IV група - животиње са индукованим дијабетесом

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и и примењеним ласером

Код животиња прве групе, здравих, које су жртвоване трећег дана, аритметичка средина телесне тежине мерене четири недеље после индуковања дијабетеса износила је 450.0 ± 35.2 g, а на дан жртвовања 480.0 ± 31.5 g. Вредности телесне тежине су статистички значајно више на дан жртвовања у односу на вредности мерене четири недеље после индуковања дијабетеса ($t=8.174$, $DF=5$, $p<0.001$).

Код животиња четврте групе, дијабетичних, које су жртвоване трећег дана, аритметичка средина телесне тежине мерене четири недеље после индуковања дијабетеса је износила 290.0 ± 40.0 g, а на дан жртвовања 273.3 ± 43.7 g. Вредности телесне тежине мерене четири недеље после индуковања дијабетеса су статистички значајно више у односу на вредности на дан жртвовања ($t=3.953$, $DF=5$, $p=0.011$).

У периоду између трећег и четвртог мерења није дошло до статистички значајне промене телесне тежине код животиња друге ($t=1.581$, $DF=5$, $p=0.175$), треће ($t=0.889$, $DF=5$, $p=0.415$), пете ($t=1.168$, $DF=5$, $p=0.296$) и шесте групе ($t=1.746$, $DF=5$, $p=0.141$), које су жртвоване трећег дана.

Код животиња које су жртвоване седмог дана вредности телесне тежине приказане су у табели 7.

Табела 7. Телесна тежина експерименталних животиња мерена четири недеље након индуковања дијабетеса и седмог дана

Група животиња	Број	Време мерења						p
		После четири недеље			Седми дан			
		$\bar{x} \pm SD$	Med	Min-Max	$\bar{x} \pm SD$	Med	Min-Max	
I група	6	431.7 ± 31.3	440.0	380.0-460.0	478.3 ± 24.8	480.0	450.0-510.0	0.002*
II група	6	423.3 ± 37.2	405.0	390.0-480.0	465.0 ± 45.5	460.0	400.0-530.0	0.002*
III група	6	450.0 ± 39.0	455.0	400.0-500.0	468.3 ± 47.9	475.0	410.0-520.0	0.028*
IV група	6	276.7 ± 25.8	270.0	250.0-320.0	253.3 ± 25.8	250.0	230.0-300.0	0.003*
V група	6	250.0 ± 55.9	225.0	200.0-350.0	253.3 ± 64.7	230.0	210.0-380.0	0.695
VI група	6	291.7 ± 65.5	300.0	210.0-370.0	273.3 ± 63.1	295.0	190.0-340.0	0.012*

\bar{x} - Аритметичка средина, SD - Стандардна девијација, Med - Медијана, *статистичка значајност

I група - здраве животиње

II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

IV група - животиње са индукованим дијабетесом

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Код животиња прве групе, здравих, које су жртвоване седмог дана, аритметичка средина телесне тежине је износила 431.7 ± 31.3 g, а на дан жртвовања 478.3 ± 24.8 g. Вредности телесне тежине су статистички значајно више на дан жртвовања у односу на вредности мерене на почетку другог дела експеримента ($t=5.813$, $DF=5$, $p=0.002$).

Код животиња друге групе, здравих са улцерацијом, које су жртвоване седмог дана, аритметичка средина телесне тежине је износила 423.3 ± 37.2 g, а на дан жртвовања 465.0 ± 45.5 g. Вредности телесне тежине су статистички значајно више на дан жртвовања у односу на вредности мерене на почетку другог дела експеримента ($t=5.926$, $DF=5$, $p=0.002$).

Код животиња треће групе, здравих са улцерацијом и примењеним ласером, које су жртвоване седмог дана, аритметичка средина телесне тежине је износила 450.0 ± 39.0 g, а на дан жртвовања 468.3 ± 47.9 g. Вредности телесна тежине су статистички значајно више на дан жртвовања у односу на вредности мерене на почетку другог дела експеримента ($t=3.051$, $DF=5$, $p=0.028$).

Код животиња четврте групе, дијабетичних, које су жртвоване седмог дана, аритметичка средина телесне тежине је износила 276.7 ± 25.8 g, а на дан жртвовања 253.3 ± 25.8 g. Вредности телесне тежине су статистички значајно ниже на дан жртвовања у односу на вредности мерене на почетку другог дела експеримента ($t=5.534$, $DF=5$, $p=0.003$).

Код животиња шесте групе, дијабетичних са улцерацијом и примењеним ласером, које су жртвоване седмог дана, аритметичка средина телесне тежине је износила 291.7 ± 65.5 g, а на дан жртвовања 273.3 ± 63.1 g. Вредности телесне тежине су статистички значајно ниже на дан жртвовања у односу на вредности мерене на почетку другог дела експеримента ($t=3.841$, $DF=5$, $p=0.012$).

У периоду између трећег и четвртог мерења није дошло до статистички значајне промене телесне тежине код животиња пете групе, дијабетичних са улцерацијом ($t=0.415$, $DF=5$, $p=0.695$).

Вредности телесне тежине код експерименталних животиња жртвованих десетог дана приказане су у табели 8.

Табела 8. Телесна тежина експерименталних животиња мерена четири недеље након индуковања дијабетеса и десетог дана

Група животиња	Број	Време мерења						p
		После четири недеље			Десети дан			
		$\bar{x} \pm SD$	Med	Min-Max	$\bar{x} \pm SD$	Med	Min-Max	
I група	6	438.3±38.2	435.0	390.0-490.0	488.3±24.8	485.0	450.0-520.0	0.001*
II група	6	430.0±49.8	445.0	360.0-480.0	475.0±62.2	495.0	400.0-530.0	0.001*
III група	6	448.3±17.2	450.0	420.0-470.0	478.3±24.8	475.0	440.0-510.0	<0.001*
IV група	6	258.3±36.6	250.0	210.0-310.0	245.0±35.1	240.0	210.0-300.0	0.043*
V група	6	263.3±51.3	260.0	210.0-340.0	286.7±48.0	275.0	240.0-360.0	0.003*
VI група	6	298.3±79.9	275.0	210.0-410.0	313.3±80.9	285.0	220.0-440.0	0.045*

\bar{x} - Аритметичка средина, SD - Стандардна девијација, Med - Медијана, *статистичка значајност

I група - здраве животиње

II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

IV група - животиње са индукованим дијабетесом

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Код животиња прве групе, здравих, које су жртвоване десетог дана, аритметичка средина телесне тежине је износила 438.3±38.2 g, а на дан жртвовања 488.3±24.8 g. Вредности телесне тежине су статистички значајно више на дан жртвовања у односу на вредности мерене на почетку другог дела експеримента ($t=7.906$, $DF=5$, $p=0.001$).

Код животиња друге групе, здравих са улцерацијом, које су жртвоване десетог дана, аритметичка средина телесне тежине је износила 430.0±49.8 g, а на дан жртвовања 475.0±62.2 g. Вредности телесне тежине су статистички значајно више на дан жртвовања у односу на вредности мерене на почетку другог дела експеримента ($t=7.268$, $DF=5$, $p=0.001$).

Код животиња треће групе, здравих са улцерацијом и примењеним ласером, које су жртвоване десетог дана, аритметичка средина телесне тежине је износила 448.3±17.2 g, а на дан жртвовања 478.3±24.8 g. Вредности телесне тежине су статистички значајно више

на дан жртвовања у односу на вредности мерене на почетку другог дела експеримента ($t=8.216$, $DF=5$, $p<0.001$).

Код животиња четврте групе, дијабетичних, које су жртвоване десетог дана, аритметичка средина телесне тежине је износила 258.3 ± 36.6 g, а на дан жртвовања 245.0 ± 35.1 g. Вредности телесне тежине су статистички значајно ниже на дан жртвовања у односу на вредности мерене на почетку другог дела експеримента ($t=2.697$, $DF=5$, $p=0.043$).

Код животиња пете групе, дијабетичних са улцерацијом, које су жртвоване десетог дана, аритметичка средина телесне тежине је износила 263.3 ± 51.3 g, а на дан жртвовања 286.7 ± 48.0 g. Вредности телесне тежине су статистички значајно више на дан жртвовања у односу на вредности мерене на почетку другог дела експеримента ($t=5.534$, $DF=5$, $p=0.003$).

Код животиња шесте групе, дијабетичних са улцерацијом и примењеним ласером, које су жртвоване десетог дана, аритметичка средина телесне тежине је износила 298.3 ± 79.9 g, а на дан жртвовања 313.3 ± 80.9 g. Вредности телесне тежине су статистички значајно више на дан жртвовања у односу на вредности мерене на почетку другог дела експеримента ($t=2.666$, $DF=5$, $p=0.045$).

6.2.2. Вредности гликемије код експерименталних животиња

У исто време када су мерене вредности телесне тежине експерименталних животиња мерене су и вредности гликемије. Гликемија је мерена укупно четири пута и вредности су приказане у табели 9, као упоредне вредности код здравих животиња и животиња са индукованим дијабетесом с обзиром да присуство улцерације и примена ласера нису утицале на вредности гликемије.

Табела 9. Гликемија код здравих и животиња са индукованим дијабетесом

Гликемија	Група	Број	\bar{x}	SD	Med	Min	Max	P
I мерење	Здрави	54	5.7	0.4	5.7	4.8	6.3	0.53
	ДМ	54	5.6	0.5	5.7	4.7	6.9	
	Укупно	108	5.7	0.5	5.7	4.7	6.9	
II мерење	Здрави	54	5.7	0.3	5.7	4.9	6.2	p<0.001 *
	ДМ	54	28.3	3.1	28.5	19.4	32.7	
	Укупно	108	17.0	11.6	12.8	4.9	32.7	
III мерење	Здрави	54	5.7	0.4	5.7	4.9	6.3	p<0.001 *
	ДМ	54	28.2	3.5	28.9	15.5	33.0	
	Укупно	108	16.9	11.6	10.9	4.9	33.0	
IV мерење	Здрави	54	5.7	0.3	5.8	5.2	6.2	p<0.001 *
	ДМ	54	28.6	3.2	29.4	17.2	32.7	
	Укупно	108	17.1	11.7	11.7	5.2	32.7	

\bar{x} - Аритметичка средина, SD - Стандардна девијација, Med - Медијана, *статистичка значајност

ДМ - дијабетес мелитус

I мерење - пре давања алоксана;

II мерење - 72h након давања алоксана;

III мерење - пре почетка другог дела експеримента (прављења улцерације)

IV мерење - на дан жртвовања животиња

Код првог мерења гликемије експерименталних животиња, пре давања алоксана, аритметичка средина гликемије здравих животиња износи 5.7 ± 0.4 mmol/l, а животиња којима је касније индукован дијабетес 5.6 ± 0.5 mmol/l. Између здравих и животиња којима је касније индукован дијабетес не постоји статистички значајна разлика у вредности гликемије ($t=0.631$, $DF=106$, $p=0.53$).

Код другог мерења гликемије експерименталних животиња, 72 h након давања алоксана, аритметичка средина гликемије здравих животиња износи 5.7 ± 0.3 mmol/l, а животиња са индукованим дијабетесом 28.3 ± 3.1 mmol/l. Између здравих и животиња са дијабетесом постоји статистички значајна разлика у вредности гликемије ($t=53.629$, $DF=106$, $p<0.001$).

Код трећег мерења гликемије експерименталних животиња, пре почетка другог дела експеримента, аритметичка средина гликемије здравих животиња износи 5.7 ± 0.4 mmol/l, а животиња са индукованим дијабетесом 28.2 ± 3.5 mmol/l. Између здравих и животиња са дијабетесом постоји статистички значајна разлика у вредности гликемије ($t=47.336$, $DF=106$, $p<0.001$).

Код четвртог мерења гликемије експерименталних животиња, на дан жртвовања животиња, аритметичка средина гликемије здравих животиња износи 5.7 ± 0.3 mmol/l, а животиња са индукованим дијабетесом 28.6 ± 3.2 mmol/l. Између здравих и животиња са дијабетесом постоји статистички значајна разлика у вредности гликемије ($t=52.238$, $DF=106$, $p<0.001$).

6.2.3. Процент зарастања улцерација

Ток зарастања улцерација праћен је уз помоћ компјутерског софтвера, мерењем величине улцерације након њеног настанка и на дан жртвовања. Површина улцерације је изражена у процентима а добијене вредности приказане су у табели 10.

Табела 10. Процент зарастања улцерација по групама у односу на дан жртвовања

Трећи дан жртвовања							
Група	Број	\bar{x}	SD	Med	Min	Max	p
II група	6	32.4	4.3	32.5	26.5	37.6	p=0.001*
III група	6	38.8	6.2	40.6	27.6	44.2	
V група	6	21.9	7.3	22.5	9.3	30.4	
VI група	6	31.7	4.2	31.4	26.6	37.3	
Седми дан жртвовања							
II група	6	79.1	7.8	80.3	70.1	87.9	p<0.001*
III група	6	93.7	3.8	93.4	88.3	100.0	
V група	6	60.7	10.7	64.0	43.3	72.3	
VI група	6	81.2	7.0	82.9	67.5	87.4	
Десети дан жртвовања							
II група	6	93.8	7.6	95.9	78.9	100.0	p=0.002*
III група	6	100.0	0.0	100.0	100.0	100.0	
V група	6	87.5	4.7	89.7	78.3	90.5	
VI група	6	94.5	3.3	93.8	90.1	100.0	

\bar{x} - Аритметичка средина, SD - Стандардна девијација, Med - Медијана, *статистичка значајност

II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Посматрањем тока зарастања улцерација код експерименталних животиња, добијени резултати показују да постоји статистички значајна разлика између група експерименталних животиња и то у свим терминима жртвовања.

На трећи дан жртвовања аритметичка средина процента зарастања рана код експерименталних животиња друге групе, здравих са улцерацијом, износи $32.4 \pm 4.3\%$, треће групе, здравих са улцерацијом и примењеним ласером, $38.8 \pm 6.2\%$, пете групе, дијабетичних са улцерацијом, $21.9 \pm 7.3\%$ и шесте групе, дијабетичних са улцерацијом и примењеним ласером, износи $31.7 \pm 4.2\%$. Између група експерименталних животиња које су жртвоване трећег дана постоји статистички значајна разлика аритметичких средина процента зарастања рана ($F=9.046$, $df=3/23$, $p=0.001$).

Разлика аритметичких средина процента зарастања рана је статистички значајна између II и V ($p=0.023$), III и V ($p<0.001$) као и између V и VI групе ($p=0.035$), али није статистички значајна између следећих група експерименталних животиња: II и III ($p=0.228$), II и VI ($p=0.997$) нити између III и VI групе ($p=0.162$).

На седми дан жртвовања аритметичка средина процента зарастања рана код експерименталних животиња друге групе, здравих са улцерацијом, износи $79.1 \pm 7.8\%$, треће групе, здравих са улцерацијом и примењеним ласером, $93.7 \pm 3.8\%$, пете групе, дијабетичних са улцерацијом, $60.7 \pm 10.7\%$ и шесте групе, дијабетичних са улцерацијом и примењеним ласером, износи $81.2 \pm 7.0\%$. Између група експерименталних животиња које су жртвоване седмог дана постоји статистички значајна разлика аритметичких средина процента зарастања рана ($F=18.639$, $df=3/23$, $p<0.001$).

Разлика аритметичких средина процента зарастања рана је статистички значајна између II и III ($p=0.018$), II и V ($p=0.003$), III и V ($p<0.001$), између III и VI групе ($p=0.048$) као и између V и VI групе ($p=0.001$), али није статистички значајна између II и VI групе експерименталних животиња ($p=0.968$).

На десети дан жртвовања аритметичка средина процента зарастања рана код експерименталних животиња друге групе, здравих са улцерацијом, износи $93.8 \pm 7.6\%$, треће групе, здравих са улцерацијом и примењеним ласером, 100% , пете групе, дијабетичних са улцерацијом, $87.5 \pm 4.7\%$ и шесте групе, дијабетичних са улцерацијом и примењеним ласером, износи $94.5 \pm 3.3\%$. Између група експерименталних животиња које

су жртвоване десетог дана постоји статистички значајна разлика аритметичких средина процента зарастања рана ($F=6.868$, $df=3/23$, $p=0.002$).

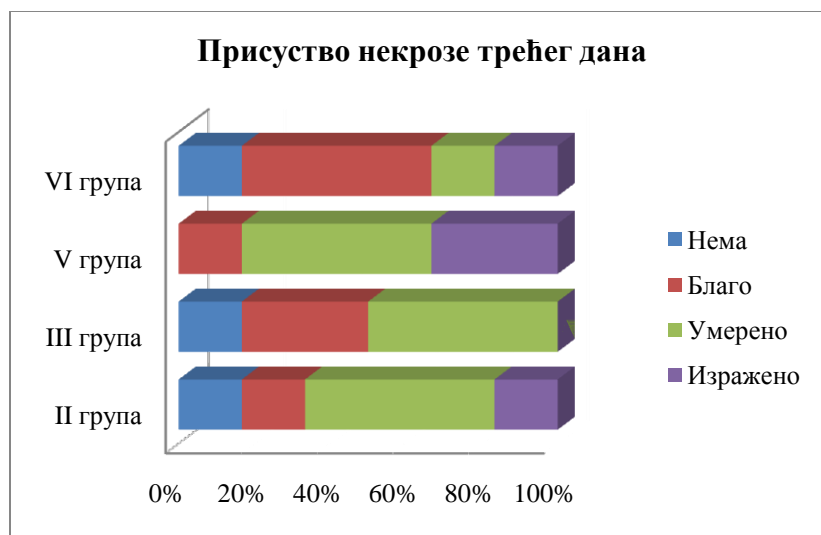
Разлика аритметичких средина процента зарастања рана је статистички значајна само између III и V групе експерименталних животиња ($p=0.001$), али није статистички значајна између II и III ($p=0.143$), II и V ($p=0.138$), II и VI ($p=0.994$), III и VI ($p=0.220$) нити између V и VI групе експерименталних животиња ($p=0.086$).

6.2.4. Резултати патохистолошке анализе

Микроскопском анализом препарата праћено је и скоровано присуство следећих патохистолошких параметара: некрозе, неутрофила, макрофага, лимфоцита, плазмоцита, фибробласта, затим присуство гранулационог ткива и степен васкуларизације. Параметри су скоровани од 0 до 3, на следећи начин: 0 - није присутно; 1 - благо присуство; 2 - умерено и 3 - изражено присуство.

6.2.4.1. Резултати патохистолошке анализе препарата животиња жртвованих трећег дана

Патохистолошком анализом утврђено је да су код животиња жртвованих трећег дана заступљени следећи посматрани параметри: некроза, неутрофили, макрофаги, фибробласти, гранулационо ткиво и васкуларизација. Није запажено присуство лимфоцита и плазмоцита.



II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

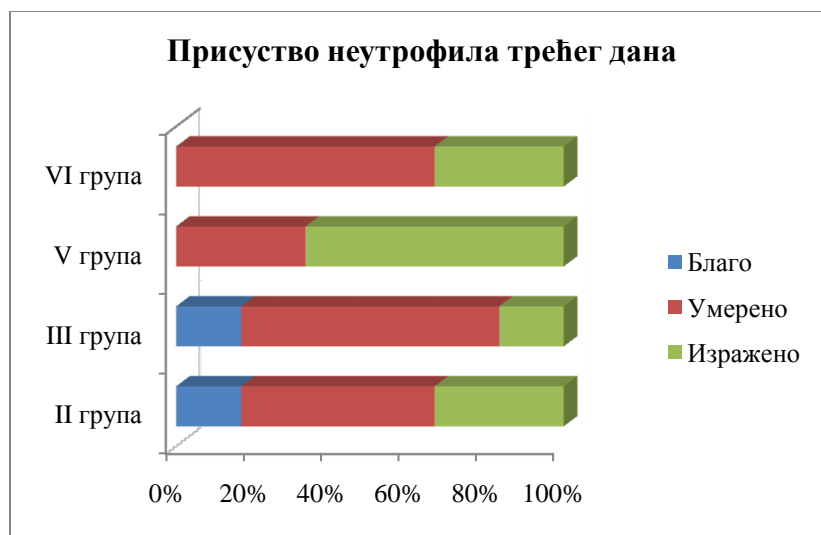
V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Графикон 1. Присуство некрозе код експерименталних група животиња жртвованих трећег дана

Код животиња друге групе, које су жртвоване трећег дана, некроза је заступљена на следећи начин: није присутна код 16.7%, благо присутна код 16.7%, умерено код 50% и изражено присутна код 16.7% експерименталних животиња (графикон 1). Код треће групе некроза није присутна код 16.7% експерименталних животиња, благо присутна код 33.3% и умерено присутна код 50% животиња, нема израженог присуства некрозе у овој групи. Све животиње пете групе имају присутну некрозу и то: 16.7% благо, 50.0% умерено и 33.3% изражено присутну. Код шесте групе некроза није присутна код 16.7%, благо присутна код 50%, умерено код 16.7% и изражено присутна код 16.7% животиња.

Код експерименталних животиња жртвованих трећег дана не постоји статистички значајна разлика у присуству некрозе ($\chi^2=3.392$, $DF=3$, $p=0.335$).



II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

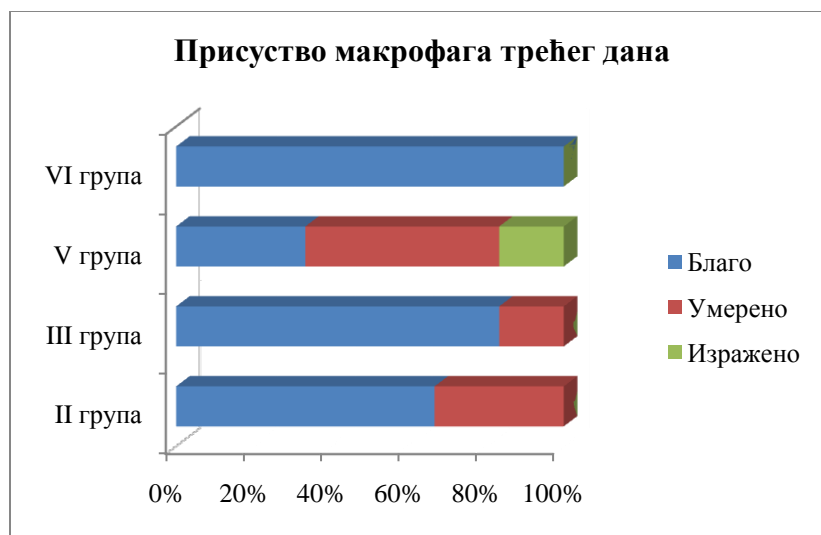
V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Графикон 2. Присуство неутрофила код експерименталних група животиња жртвованих трећег дана

Неутрофили су присутни код свих група животиња које су жртвоване трећег дана (графикон 2). Заступљеност неутрофила је била следећа: друга група - благо присуство код 16.7%, умерено код 50% и изражено код 33.3%; трећа група - благо код 16.7%, умерено код 66.7% и изражено присуство код 16.7%; пета група - умерено присуство код 33.3% и изражено код 66.7%; и шеста група - умерено код 66.7% и изражено присуство код 33.3% експерименталних животиња.

Код експерименталних животиња жртвованих трећег дана не постоји статистички значајна разлика у присуству неутрофила ($hi\text{-}kvadrat=3.711$, $DF=3$, $p=0.294$).



II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

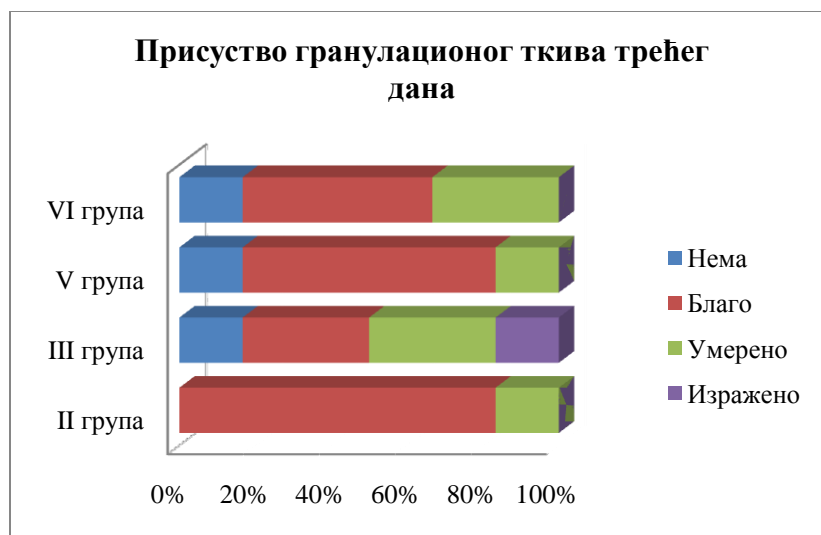
V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Графикон 3. Присуство макрофага код експерименталних група животиња жртвованих трећег дана

Макрофаги су присутни код свих група животиња које су жртвоване трећег дана (графикон 3). Заступљеност макрофага је била следећа: друга група - благо присуство код 66.7% и умерено код 33.3%; трећа група - благо код 83.3% и умерено код 16.7%; пета група - благо код 33.3%, умерено присуство код 50% и изражено код 16.7%; и шеста група - благо присуство код свих експерименталних животиња - 100%.

Код експерименталних животиња жртвованих трећег дана не постоји статистички значајна разлика у присуству макрофага ($\chi^2=7.130$, $DF=3$, $p=0.068$).



II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

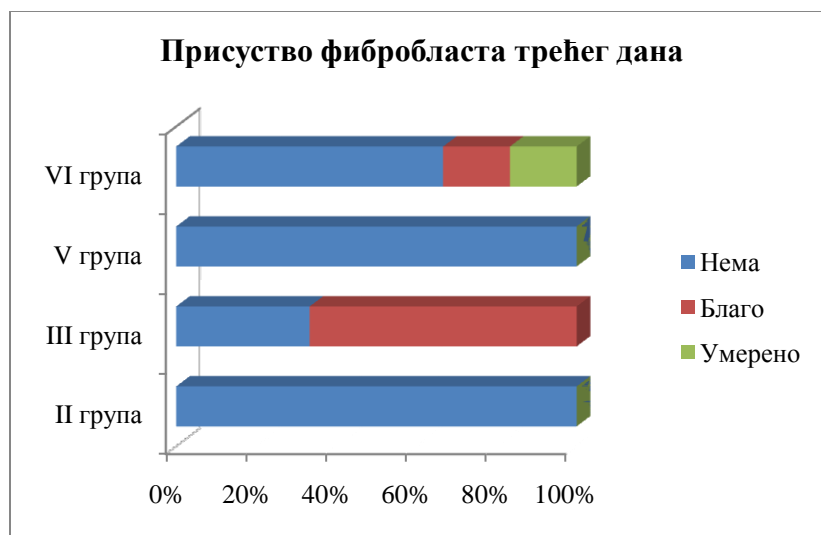
V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Графикон 4. Присуство гранулативног ткива код експерименталних група животиња жртвованих трећег дана

Гранулативно ткиво је присутно код свих група животиња које су жртвоване трећег дана (графикон 4). Заступљеност гранулативног ткива је била следећа: друга група - благо присуство код 88.3% и умерено код 16.7%; трећа група - није присутно код 16.7%, благо код 33.3%, умерено код 33.3% и изражено присуство код 16.7%; пета група - није присутно код 16.7%, благо код 66.7% и умерено присуство код 16.7%; и шеста група - није присутно код 16.7%, благо присуство код 50% и умерено присуство код 33.3% животиња.

Код експерименталних животиња жртвованих трећег дана не постоји статистички значајна разлика у присуству гранулативног ткива ($hi\text{-}kvadrat=1.203$, $DF=3$, $p=0.752$).



II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

V група - дијабетичне са улцерацијом

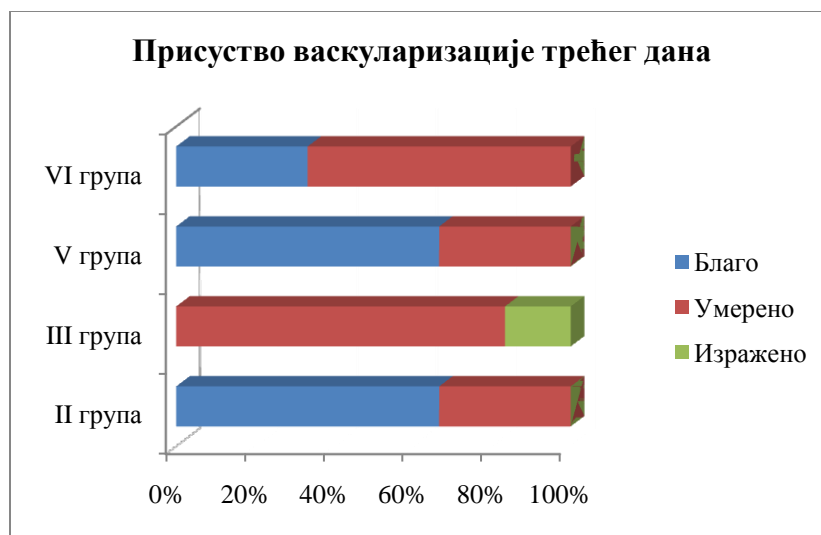
VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Графикон 5. Присуство фибробласта код експерименталних група животиња жртвованих трећег дана

Код животиња које су жртвоване трећег дана фибробласти су присутни само код треће и шесте групе (графикон 5). Заступљеност фибробласта је била следећа: трећа група није присутно код 33.3% и благо присутно код 66.7%, а код шесте групе није присутно код 66.7%, благо присуство код 16.7% и умерено присуство код 16.7% животиња.

Код експерименталних животиња жртвованих трећег дана постоји статистички значајна разлика у присуству фибробласта ($\chi^2=8.749$, $DF=3$, $p=0.033$).

Статистички значајна разлика постоји између II и III групе ($p=0.019$) као и између III и V групе ($p=0.019$), али не постоји између II и V ($p=1.0$), II и VI ($p=0.140$), III и VI ($p=0.476$) као ни између V и VI групе ($p=0.140$).



II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Графикон 6. Васкуларизација код експерименталних група животиња жртвованих трећег дана

Код животиња које су жртвоване трећег дана заступљеност васкуларизације је била следећа: друга група - благо присуство код 66.7% и умерено код 33.3%; трећа група - умерено код 83.3% и изражено присуство код 16.7%; пета група - благо код 66.7% и умерено присуство код 33.3%; и шеста група - благо присуство код 33.3% и умерено присуство код 66.7% експерименталних животиња (графикон 6).

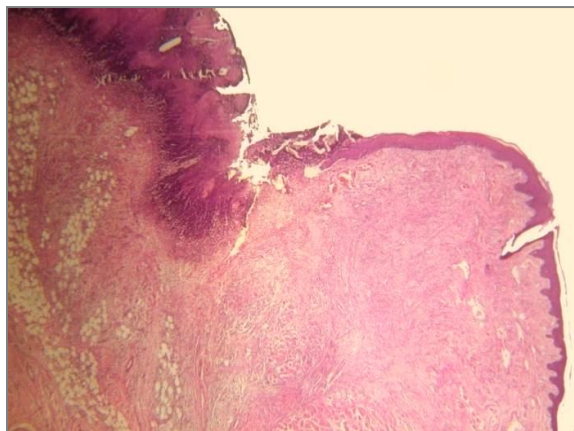
Код експерименталних животиња жртвованих трећег дана постоји статистички значајна разлика у васкуларизацији ($\chi^2=8.199$, $DF=3$, $p=0.042$).

Статистички значајна разлика постоји између II и III групе ($p=0.018$) као и између III и V групе ($p=0.018$), али не постоји између II и V ($p=1.0$), II и VI ($p=0.269$), III и VI ($p=0.092$) као ни између V и VI групе ($p=0.269$).

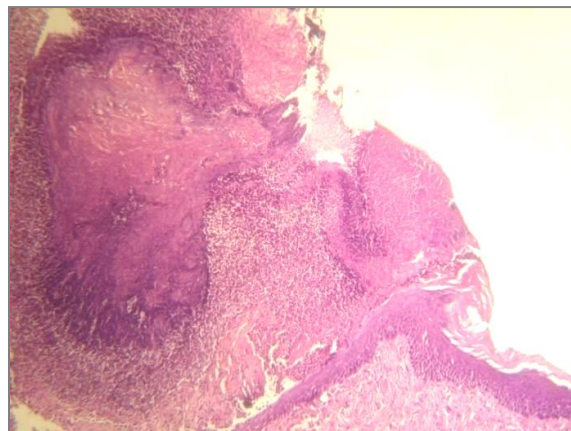
- Патохистолошки налаз ткива животиња жртвованих трећег дана

- **Друга група - здраве експерименталне животиње са улцерацијом**

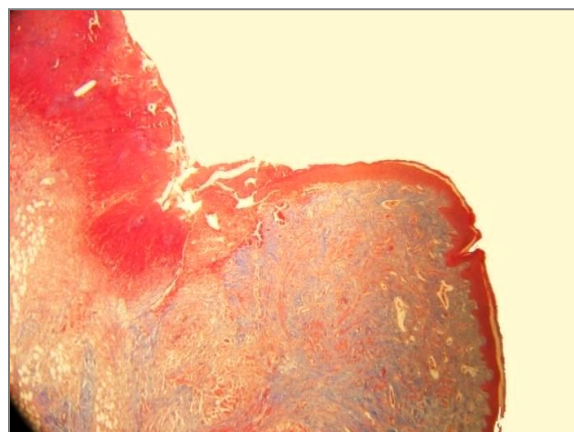
Код експерименталних животиња друге групе, здравих са улцерацијом, које су жртвоване трећег дана, патохистолошком анализом уочава се присуство улцерације, односно прекид континуитета мукозе и умерено до веома изражена некроза са мноштвом неутрофила (слике 84-87).



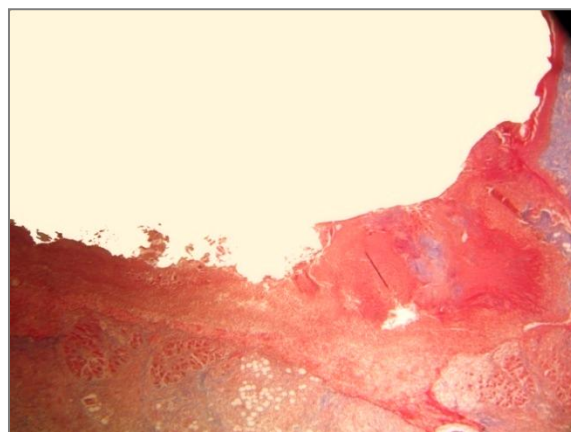
Слика 84. Патохистолошки налаз у II групи животиња жртвованих 3. дана. Прекид континуитета мукозе и изражена неутрофилна инфилтрација (ХЕ, x40).



Слика 85. Детаљ са слике 84. Улцерација, умерена некроза и изражена неутрофилна инфилтрација (ХЕ, x100).



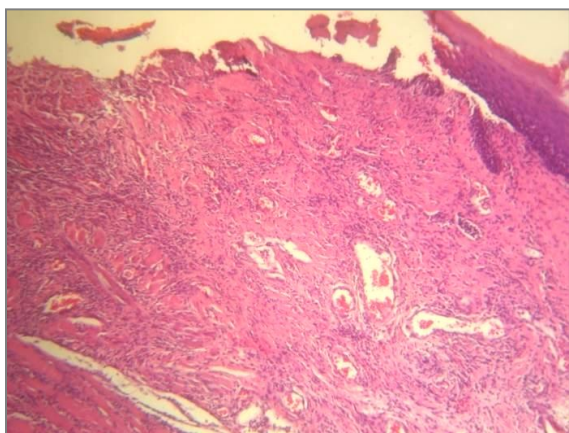
Слика 86. Патохистолошки налаз у II групи животиња жртвованих 3. дана (Masson trichrome, x40).



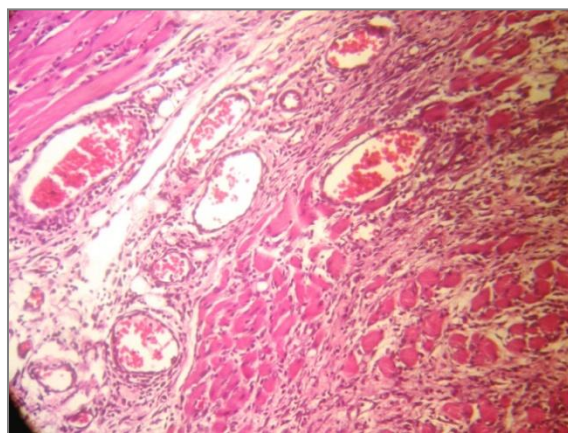
Слика 87. Патохистолошки налаз у II групи животиња жртвованих 3. дана (Masson trichrome, x40).

- **Трећа група - здраве експерименталне животиње са улцерацијом и примењеним ласером**

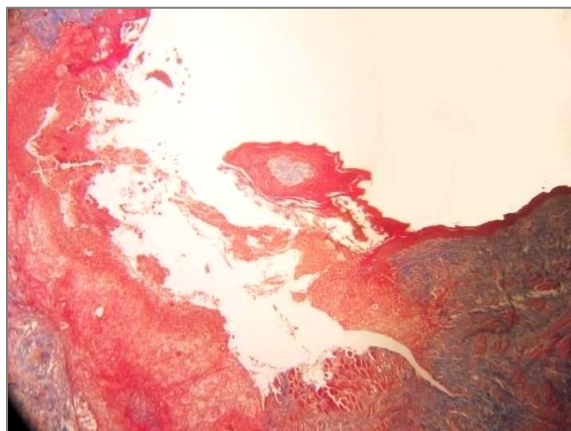
Код експерименталних животиња треће групе, здравих са улцерацијом и примењеним ласером, које су жртвоване трећег дана, уочава се прекид континуитета мукозе, благо до умерено присуство некрозе, умерена неутрофилна инфилтрација, благо присуство фибробласта, као и умерено до веома изражена васкуларизација (слике 88-91).



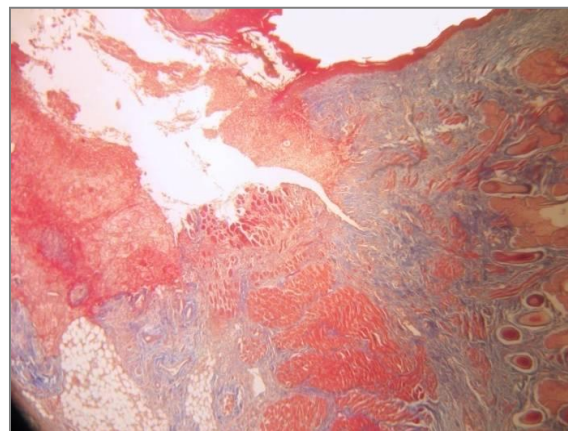
Слика 88. Патохистолошки налаз у III групи животиња жртвованих 3. дана. Прекид континуитета мукозе, умерено изражена васкуларизација и умерена неутрофилна инфилтрација (ХЕ, x100).



Слика 89. Детаљ са слике 88. Изражена васкуларизација (ХЕ, x200)



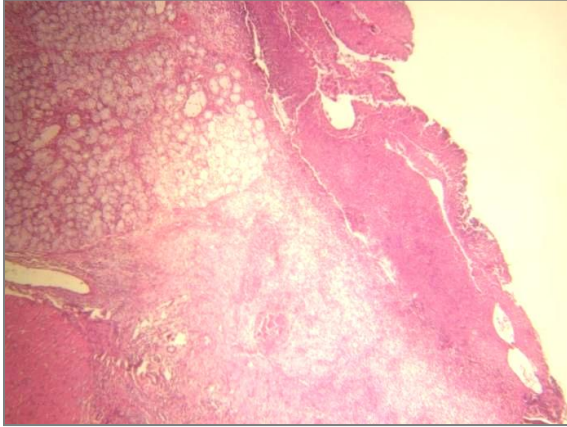
Слика 90. Патохистолошки налаз у III групи животиња жртвованих 3. дана (Masson trichrome, x40).



Слика 91. Патохистолошки налаз у III групи животиња жртвованих 3. дана (Masson trichrome, x40).

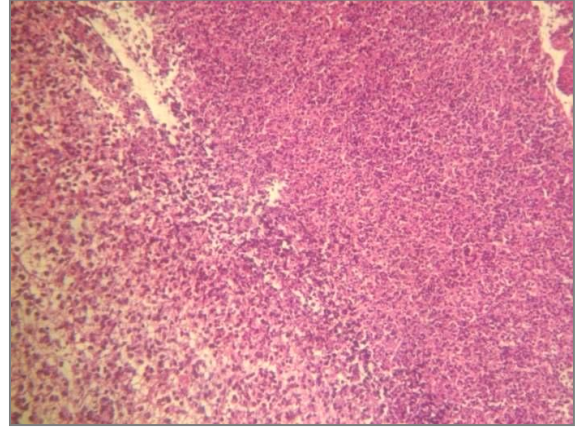
- Пета група - животиње са индукованим дијабетесом и улцерацијом

Код експерименталних животиња пете групе, дијабетичних са улцерацијом, које су жртвоване трећег дана, уочава се веома изражена некроза као и изражена неутрофилна инфилтрација (слике 92-95).

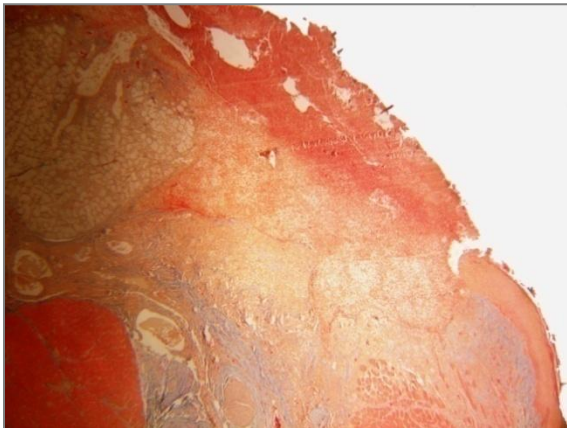


Слика 92. Патохистолошки налаз у V групи животиња жртвованих 3. дана.

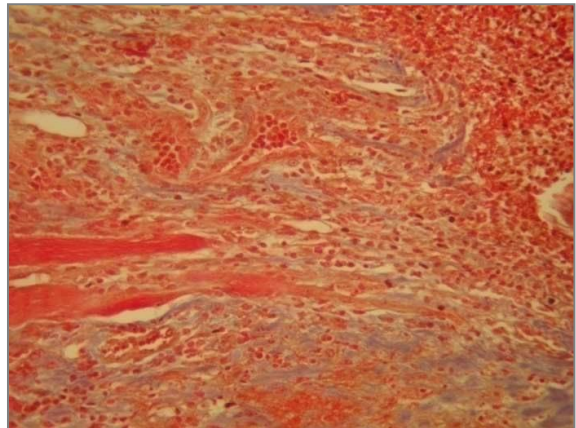
Изражена некроза и изражена неутрофилна инфилтрација (ХЕ, x40).



Слика 93. Детаљ са слике 92. Изражена неутрофилна инфилтрација (ХЕ, x200).



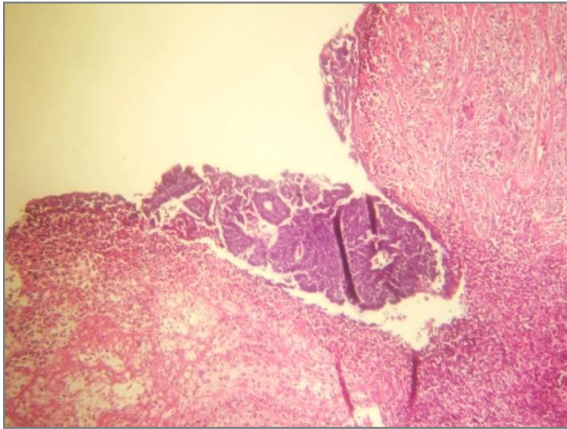
Слика 94. Патохистолошки налаз у V групи животиња жртвованих 3. дана (Masson trichrome, x40).



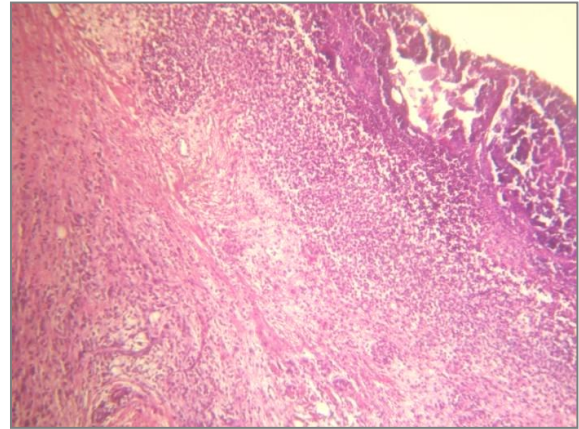
Слика 95. Детаљ са слике 94 (Masson trichrome, x200).

- **Шеста група - животиње са индукованим дијабетесом, улцерацијом и примењеним ласером**

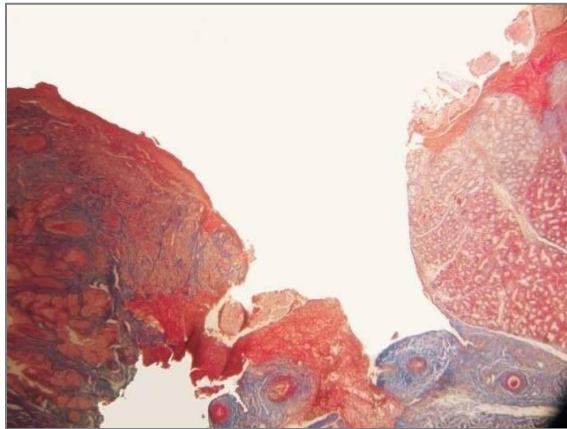
Код експерименталних животиња шесте групе, дијабетичних са улцерацијом и примењеним ласером, које су жртвоване трећег дана, патохистолошком анализом уочава се прекид континуитета мукозе, благо до умерено присутна некроза, изражена неутрофилна инфилтрација, благо присуство макрофага и присуство ретких фибробласта (слике 96-99).



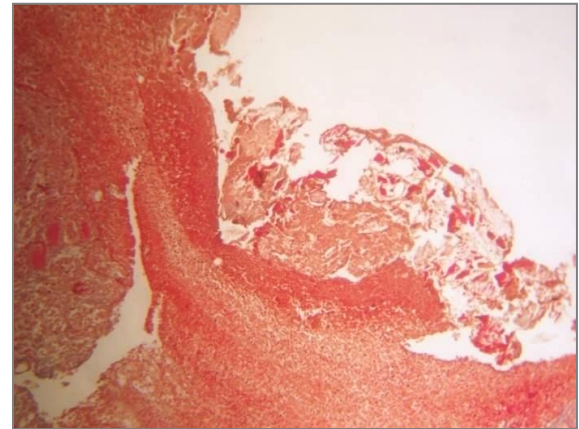
Слика 96. Патохистолошки налаз у VI групи животиња жртвованих 3. дана. Прекид континуитета мукозе и умерена некроза (ХЕ, x100).



Слика 97. Патохистолошки налаз у VI групи животиња жртвованих 3. дана. Умерена некроза и изражена неутрофилна инфилтрација (ХЕ, x100).



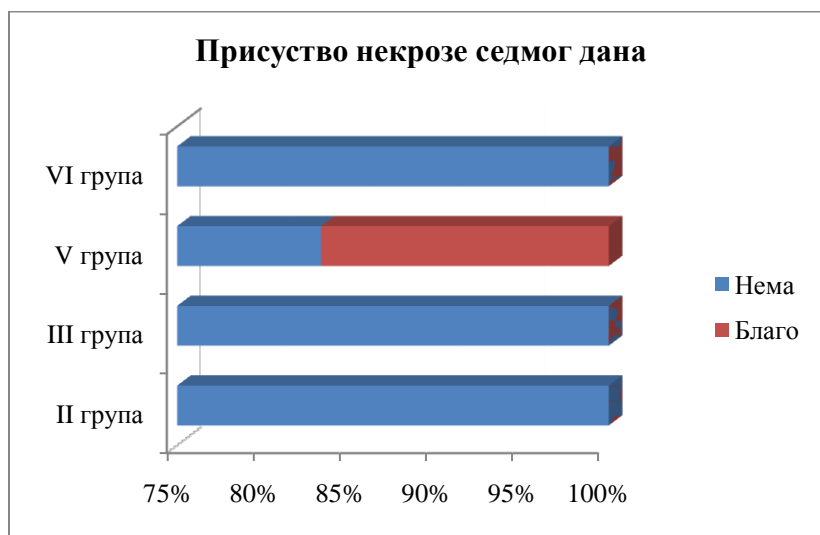
Слика 98. Патохистолошки налаз у VI групи животиња жртвованих 3. дана (Masson trichrome, x40).



Слика 99. Патохистолошки налаз у VI групи животиња жртвованих 3. дана (Masson trichrome, x100).

6.2.4.2. Резултати патохистолошке анализе препарата животиња жртвованих седмог дана

Патохистолошком анализом утврђено је да су код животиња жртвованих седмог дана заступљени сви посматрани параметри.



II група - здраве животиње са улцерацијом

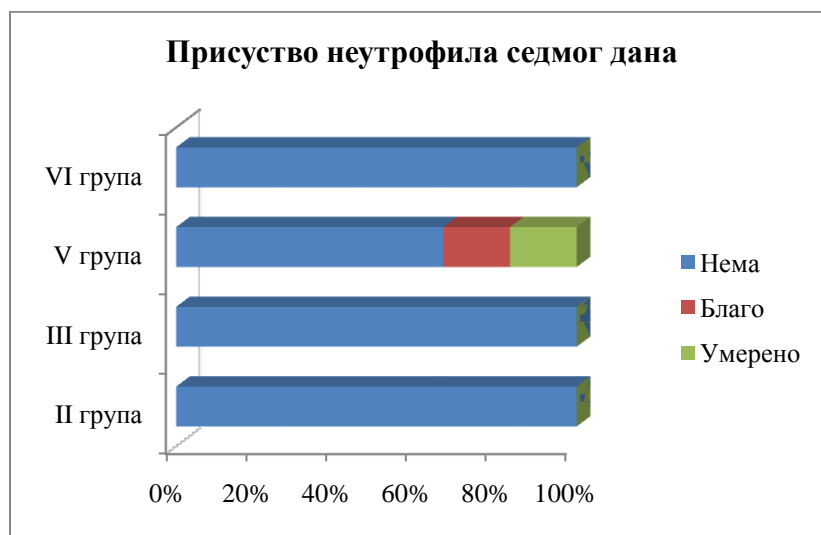
III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Графикон 7. Присуство некрозе код експерименталних група животиња жртвованих седмог дана

Код животиња које су жртвоване седмог дана благо присуство некрозе (16.7%) је запажено само код пете групе експерименталних животиња, дијабетичних са улцерацијом. Између група не постоји статистички значајна разлика у присуству некрозе ($hi-kvadrat=3.000$, $DF=3$, $p=0.392$).



II група - здраве животиње са улцерацијом

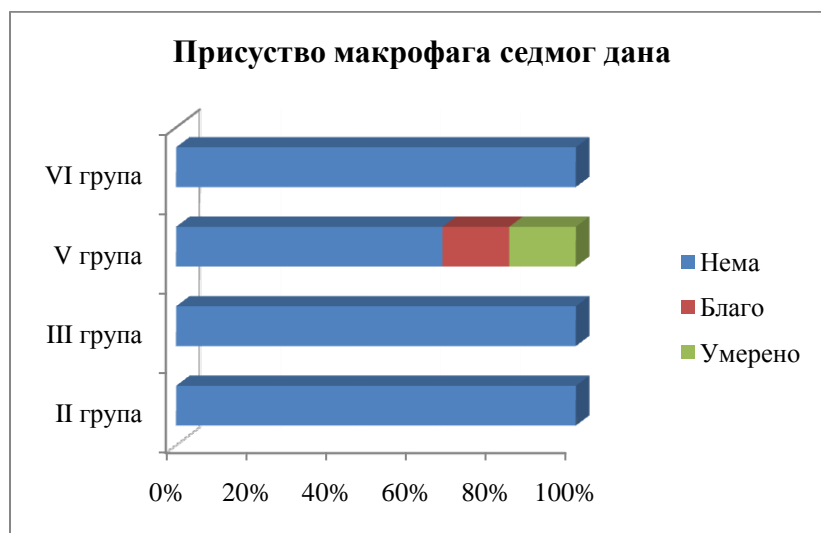
III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Графикон 8. Присуство неутрофила код експерименталних група животиња жртвованих седмог дана

Неутрофили су седмог дана жртвовања присутни само код пете групе експерименталних животиња, дијабетичних са улцерацијом. Заступљеност неутрофила је следећа: није присутно код 66.7%, благо присуство код 16.7% и умерено присуство код 16.7% експерименталних животиња. Између група не постоји статистички значајна разлика у присуству неутрофила ($hi\text{-}k\text{-}kvadrat=6.261$, $DF=3$, $p=0.100$).



II група - здраве животиње са улцерацијом

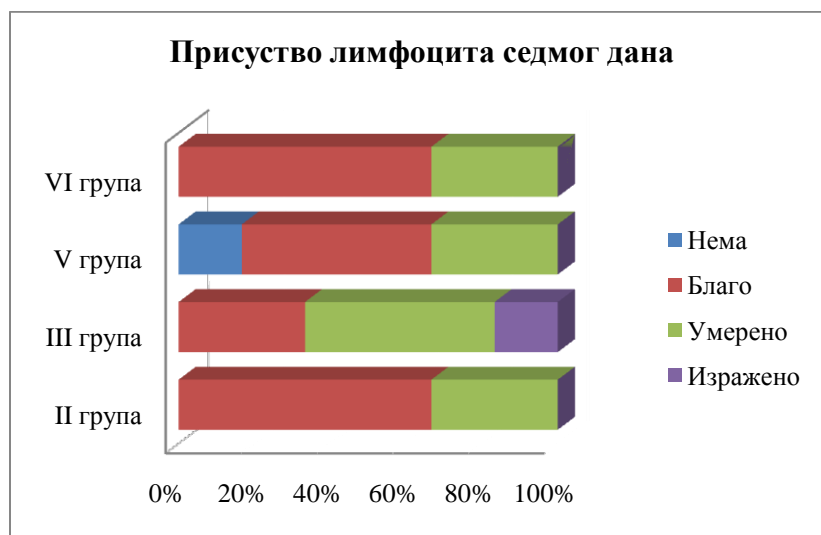
III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Графикон 9. Присуство макрофага код експерименталних група животиња жртвованих седмог дана

Макрофаги су седмог дана жртвовања присутни само код пете групе експерименталних животиња, дијабетичних са улцерацијом. Заступљеност макрофага је следећа: није присутно код 66.7%, благо присуство код 16.7% и умерено присуство код 16.7% експерименталних животиња. Између група не постоји статистички значајна разлика у присуству неутрофила ($hi\text{-}k\text{-}kvadrat=6.261$, $DF=3$, $p=0.100$).



II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

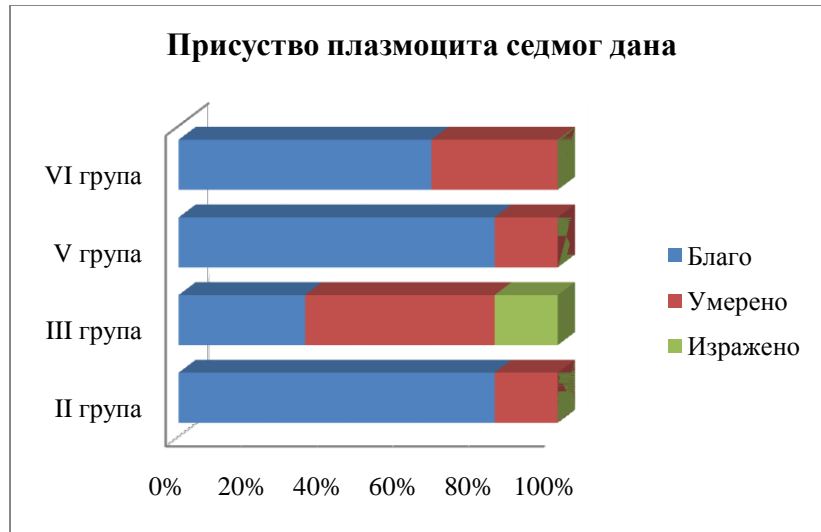
V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Графикон 10. Присуство лимфоцита код експерименталних група животиња жртвованих седмог дана

Лимфоцити су присутни код свих група животиња које су жртвоване седмог дана. Заступљеност лимфоцита је била следећа: друга група - благо присуство код 66.7% и умерено код 33.3%; трећа група - благо код 33.3%, умерено код 50% и изражено код 16.7%; пета група - није присутно код 16.7%, благо присуство код 50% и умерено присуство код 33.3%; и шеста група - благо присуство код 66.7% и умерено код 33.3% експерименталних животиња.

Код експерименталних животиња жртвованих седмог дана не постоји статистички значајна разлика у присуству лимфоцита ($\chi^2=2.862$, $DF=3$, $p=0.413$).



II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

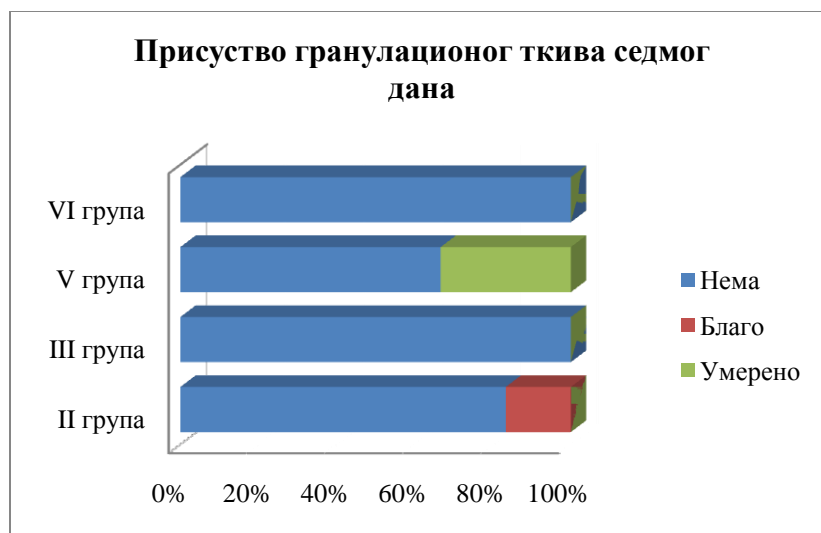
V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Графикон 11. Присуство плазмоцита код експерименталних група животиња жртвованих седмог дана

Плазмоцити су присутни код свих група животиња које су жртвоване седмог дана. Заступљеност плазмоцита је била следећа: друга група - благо присуство код 83.3% и умерено код 16.7%; трећа група - благо код 33.3%, умерено код 50% и изражено код 16.7%; пета група - благо присуство код 83.3% и умерено присуство код 16.7%; и шеста група - благо присуство код 66.7% и умерено код 33.3% експерименталних животиња.

Код експерименталних животиња жртвованих седмог дана не постоји статистички значајна разлика у присуству плазмоцита ($hi\text{-}kvadrat=4.850$, $DF=3$, $p=0.183$).



II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

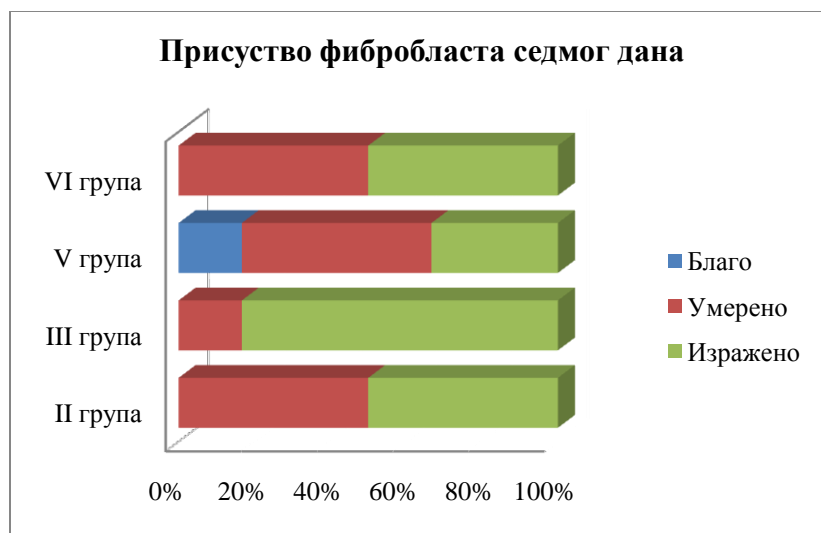
V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Графикон 12. Присуство гранулативног ткива код експерименталних група животиња жртвованих седмог дана

Код животиња које су жртвоване седмог дана гранулативно ткиво је присутно само код друге и пете групе. Заступљеност гранулативног ткива је била следећа: друга група - није присутно код 83.3% и благо присутно код 16.7%, а код пете групе - није присутно код 66.7% и умерено присуство код 33.3% животиња.

Код експерименталних животиња жртвованих седмог дана не постоји статистички значајна разлика у присуству гранулативног ткива ($hi\text{-}kvadrat=4.263$, $DF=3$, $p=0.234$).



II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

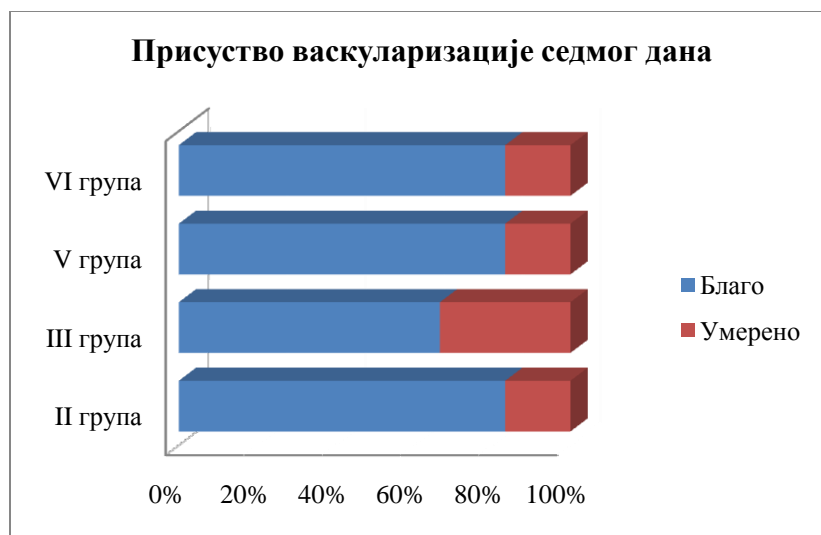
V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Графикон 13. Присуство фибробласта код експерименталних група животиња
жртвованих седмог дана

Фибробласти су присутни код свих група животиња које су жртвоване седмог дана. Заступљеност фибробласта је била следећа: друга група - умерено присуство код 50% и изражено код 50%; трећа група - умерено код 16.7% и изражено код 83.3%; пета група - благо присуство код 16.7% , умерено код 50% и изражено присуство код 33.3%; и шеста група - умерно присуство код 50% и изражено код 50% експерименталних животиња.

Код експерименталних животиња жртвованих седмог дана не постоји статистички значајна разлика у присуству фибробласта ($\chi^2=3.502$, $DF=3$, $p=0.320$).



II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Графикон 14. Васкуларизација код експерименталних група животиња жртвованих седмог дана

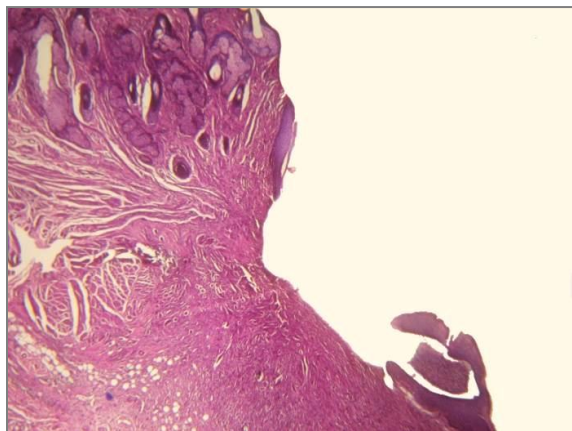
Заступљеност васкуларизације код животиња жртвованих седмог дана била је следећа: друга група - благо код 83.3% и умерено присуство код 16.7%; трећа група - благо код 66.7% и умерено присуство код 33.3%; пета група - благо код 83.3% и умерено код 16.7%; и шеста група - благо код 83.3% и умерено присуство код 16.7% експерименталних животиња.

Код експерименталних животиња жртвованих седмог дана не постоји статистички значајна разлика у васкуларизацији ($\chi^2=0.726$, $DF=3$, $p=0.867$).

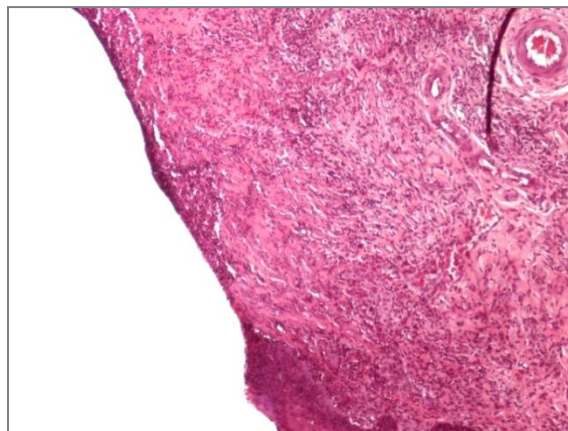
- Патохистолошки налаз ткива животиња жртвованих седмог дана

- Друга група - здраве експерименталне животиње са улцерацијом

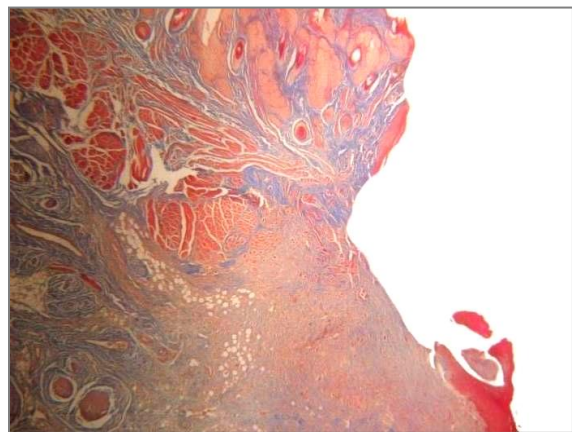
Код експерименталних животиња друге групе, здравих са улцерацијом, које су жртвоване седмог дана, патохистолошком анализом уочава се прекид континуитета мукозе, умерено до изражено присуство фибробласта, благо изражени лимфоцити и плазмоцити (слике 100-103).



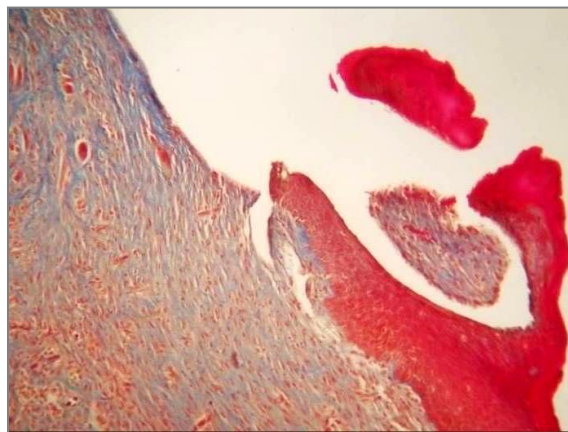
Слика 100. Патохистолошки налаз у II групи животиња жртвованих 7. дана. Прекид континуитета мукозе (ХЕ, x40).



Слика 101. Патохистолошки налаз у II групи животиња жртвованих 7. дана. Прекид континуитета мукозе и умерено присуство фибробласта (ХЕ, x100).



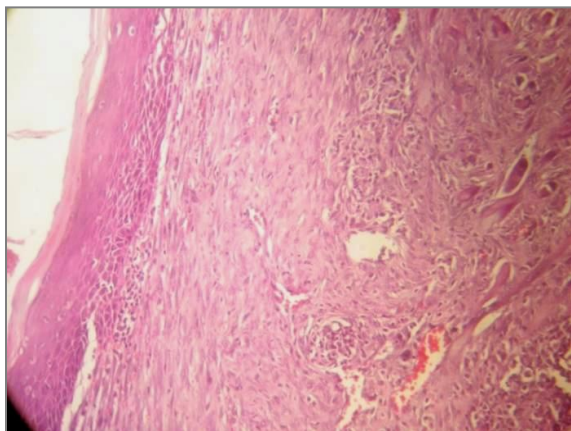
Слика 102. Патохистолошки налаз у II групи животиња жртвованих 7. дана (Masson trichrome, x40).



Слика 103. Патохистолошки налаз у II групи животиња жртвованих 7. дана (Masson trichrome, x100).

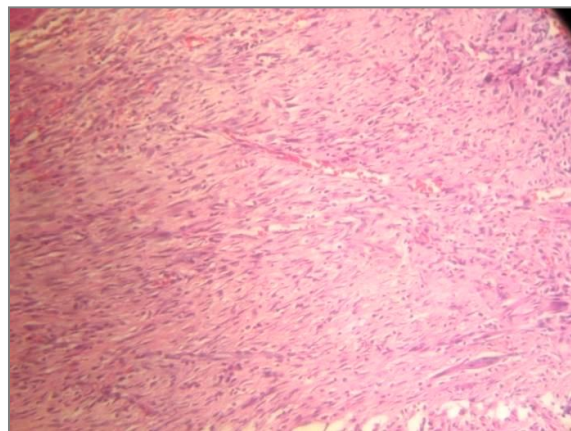
- **Трећа група - здраве експерименталне животиње са улцерацијом и примењеним ласером**

Код треће групе експерименталних животиња, здравих са улцерацијом и примењеним ласером, које су жртвоване седмог дана, код највећег броја случајева уочава се потпуна реепителизација, умерено присуство лимфоцита и плазмоцита, веома изражени фибробласти и благо изражена васкуларизација (слике 104-107).

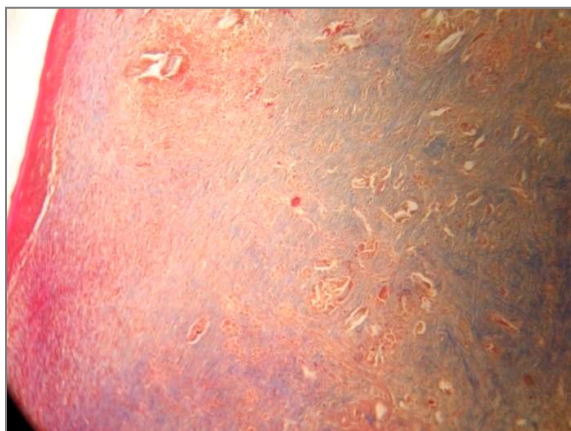


Слика 104. Патохистолошки налаз у III групи животиња жртвованих 7. дана.

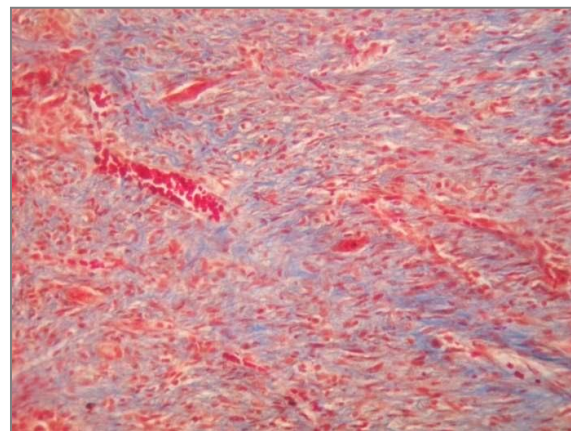
Потпуна реепителизација, умерено изражени лимфоцити и плазмоцити, и веома изражени фибробласти (ХЕ, x200).



Слика 105. Патохистолошки налаз у III групи животиња жртвованих 7. дана
Благо изражена васкуларизација (ХЕ, x200).



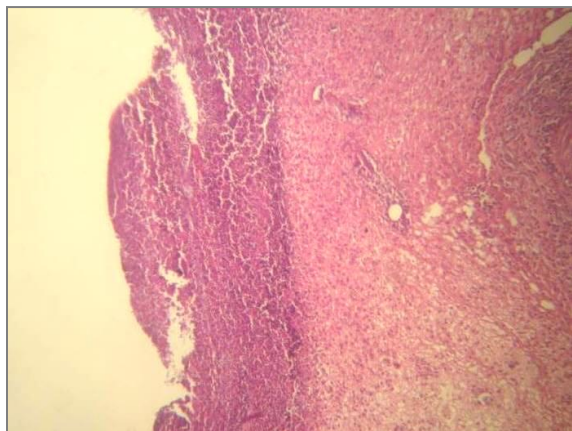
Слика 106. Патохистолошки налаз у III групи животиња жртвованих 7. дана
(Masson trichrome, x100).



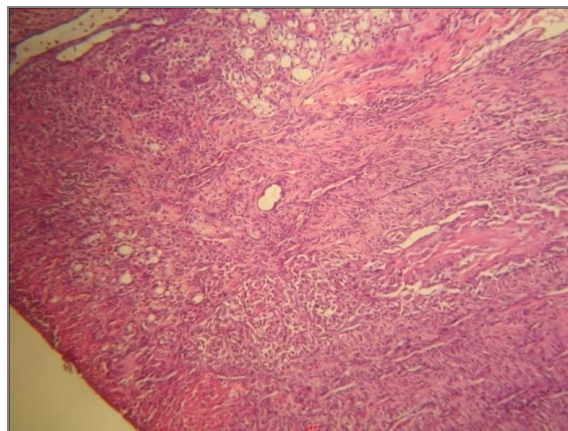
Слика 107. Патохистолошки налаз у III групи животиња жртвованих 7. дана
(Masson trichrome, x200).

- Пета група - животиње са индукованим дијабетесом и улцерацијом

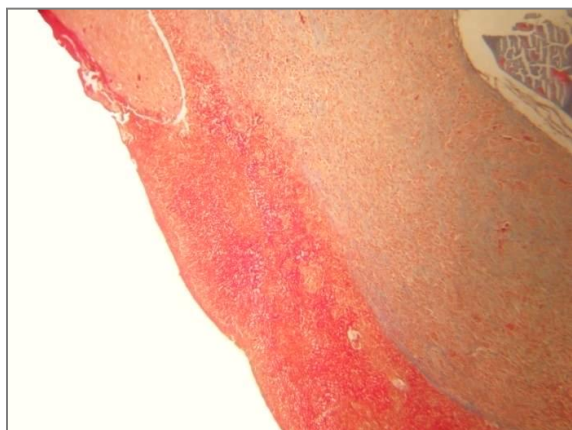
Код пете групе експерименталних животиња, дијабетичних са улцерацијом, које су жртвоване седмог дана, патохистолошком анализом уочава се умерена некроза, умерена инфилтрација неутрофилима, блага инфилтрација макрофагима, лимфоцитима и плазмоцитима, као и благо изражена васкуларизација (слике 108-111).



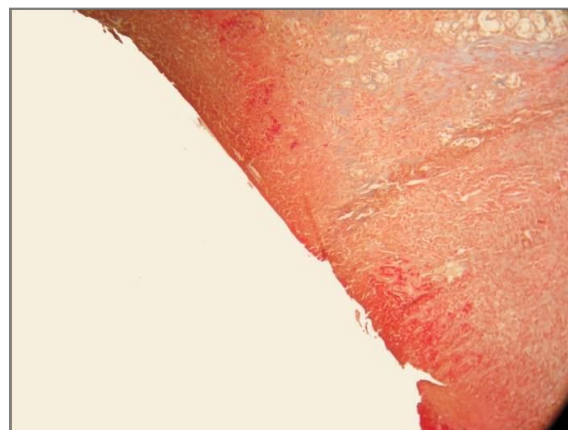
Слика 108. Патохистолошки налаз у V групи животиња жртвованих 7. дана. Умерено изражени фибробласти, блага инфилтрација макрофагима, лимфоцитима и плазмоцитима (ХЕ, x100).



Слика 109. Патохистолошки налаз у V групи животиња жртвованих 7. дана. Умерено присуство неутрофила, лимфоцита и плазмоцита, и благо изражена васкуларизација (ХЕ, x100).



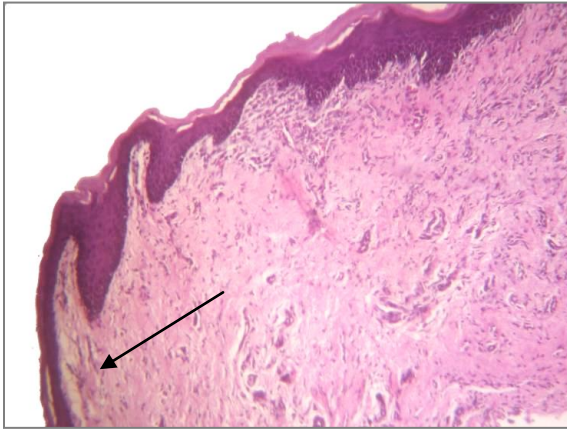
Слика 110. Патохистолошки налаз у V групи животиња жртвованих 7. дана (Masson trichrome, x100).



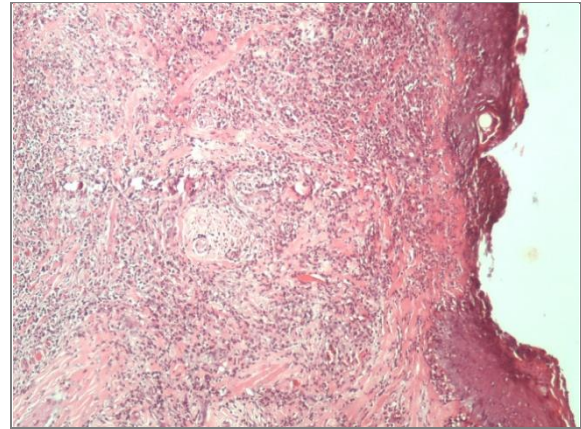
Слика 111. Патохистолошки налаз у V групи животиња жртвованих 7. дана (Masson trichrome, x100).

- **Шеста група - животиње са индукованим дијабетесом, улцерацијом и примењеним ласером**

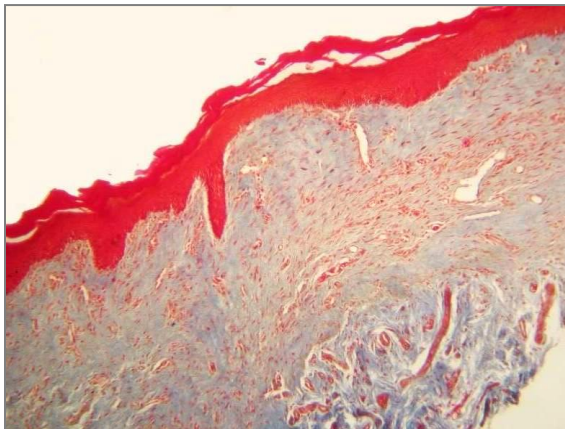
Код експерименталних животиња шесте групе, дијабетичних са улцерацијом и примењеним ласером, које су жртвоване седмог дана, патохистолошком анализом уочава се, код највећег броја случајева, реепителизација са истањеним и заравњеним епителом, са мање израженим папилама, умерено до изражено присуство фибробласта, као и блага инфилтрација лимфоцитима и плазмоцитима (слике 112-115).



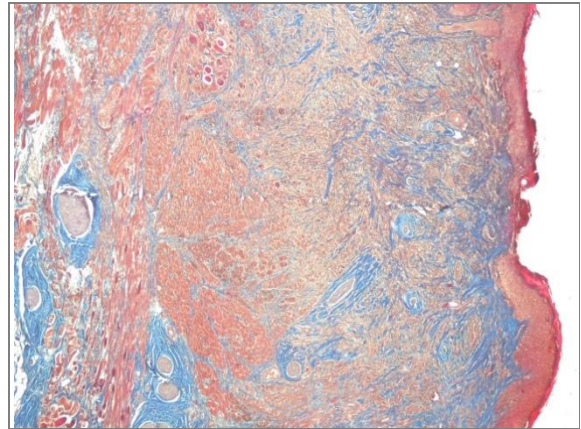
Слика 112. Патохистолошки налаз у VI групи животиња жртвованих 7. дана. Реепителизација са истањеним епителом (ХЕ, x100).



Слика 113. Патохистолошки налаз у VI групи животиња жртвованих 7. дана. Изражено присуство фибробласта (ХЕ, x100).



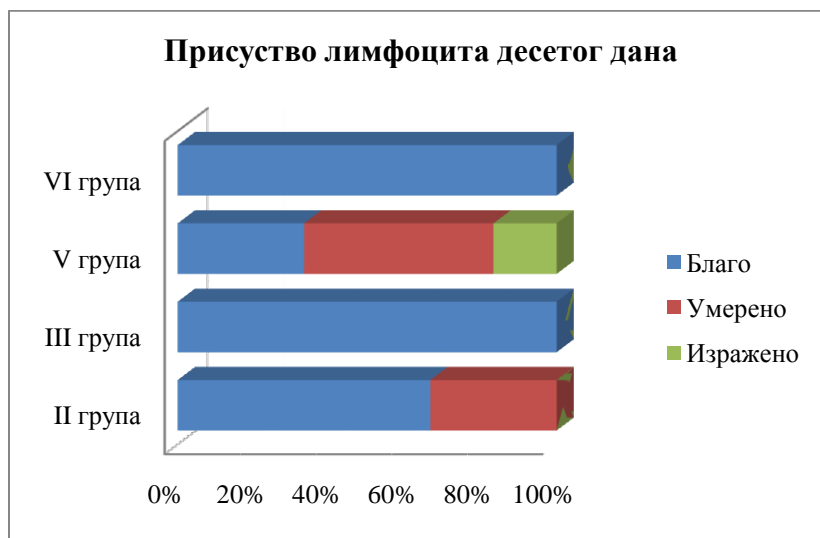
Слика 114. Патохистолошки налаз у VI групи животиња жртвованих 7. дана (Masson trichrome, x100).



Слика 115. Патохистолошки налаз у VI групи животиња жртвованих 7. дана (Masson trichrome, x100).

6.2.4.3. Резултати патохистолошке анализе препарата животиња жртвованих десетог дана

Патохистолошком анализом утврђено је да су код животиња жртвованих десетог дана заступљени следећи посматрани параметри: лимфоцити, плазмоцити, фибробласти и васкуларизација. Није запажено присуство некрозе, неутрофила, макрофага и гранулационог ткива.



II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

V група - дијабетичне са улцерацијом

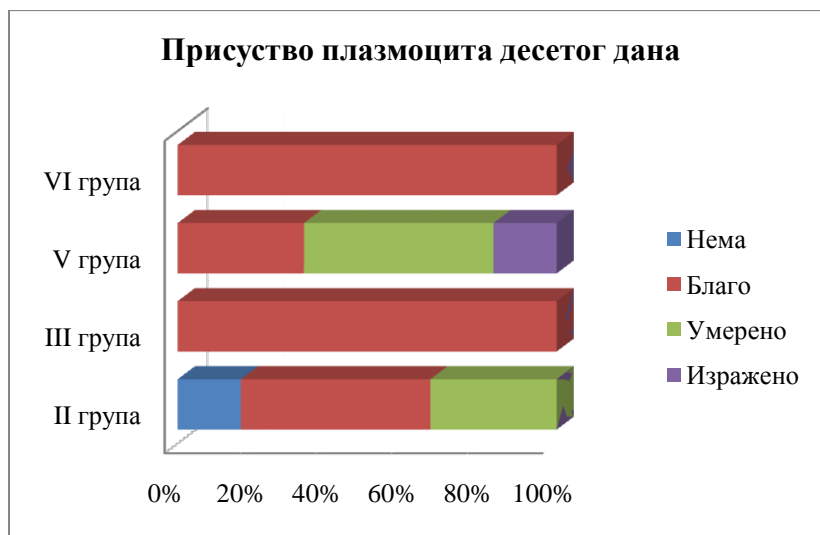
VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Графикон 15. Присуство лимфоцита код експерименталних група животиња жртвованих десетог дана

Лимфоцити су присутни код свих група животиња које су жртвоване десетог дана. Заступљеност лимфоцита је била следећа: друга група - благо присуство код 66.7% и умерено код 33.3%; трећа група - благо код 100%; пета група - благо присуство код 33.3%, умерено код 50% и изражено присуство код 16.7%; и шеста група - благо присуство код свих експерименталних животиња (100%).

Код експерименталних животиња жртвованих десетог дана постоји статистички значајна разлика у присуству лимфоцита ($\chi^2=9.556$, $DF=3$, $p=0.023$).

Разлика је статистички значајна између III и V групе ($p=0.021$) као и између V и VI ($p=0.021$), али није статистички значајна између II и III ($p=0.138$), II и V ($p=0.212$), II и VI ($p=0.138$) као ни између III и VI ($p=1.0$).



II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

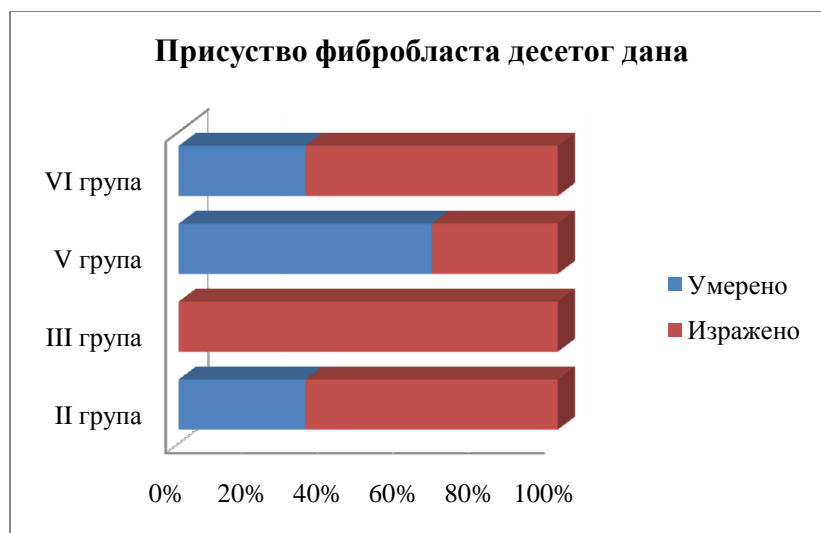
V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Графикон 16. Присуство плазмоцита код експерименталних група животиња жртвованих десетог дана

Плазмоцити су присутни код свих група животиња које су жртвоване десетог дана. Заступљеност плазмоцита је била следећа: друга група - није присутно код 16.7%, благо присуство код 50% и умерено код 33.3%; трећа група - благо код 100%; пета група - благо присуство код 33.3%, умерено код 50% и изражено присуство код 16.7%; и шеста група - благо присуство код свих експерименталних животиња (100%).

Код експерименталних животиња жртвованих десетог дана не постоји статистички значајна разлика у присуству плазмоцита ($hi\text{-}kvadrat=7.740$, $DF=3$, $p=0.052$).



II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

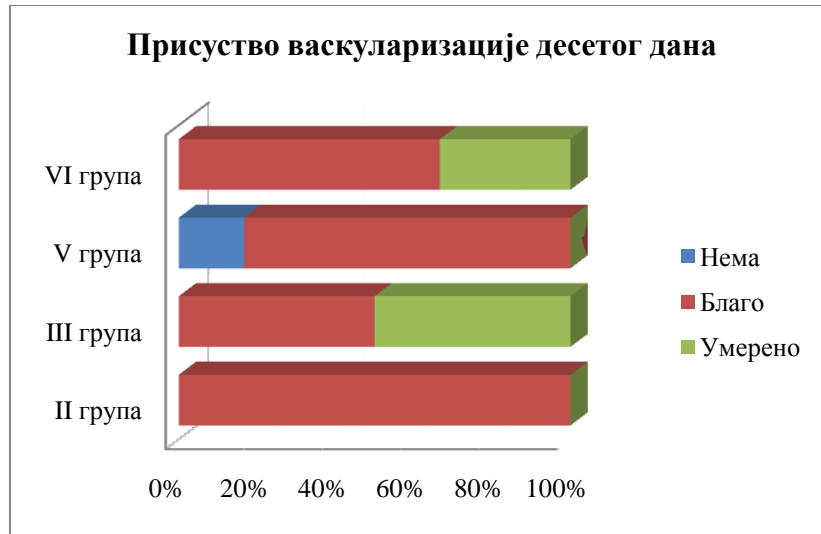
V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Графикон 17. Присуство фибробласта код експерименталних група животиња
жртвованих десетог дана

Фибробласти су присутни код свих група животиња које су жртвоване десетог дана. Заступљеност фибробласта је била следећа: друга група - умерено присуство код 33.3% и изражено код 66.7%; трећа група - изражено код 100%; пета група - умерено присуство код 66.7% и изражено присуство код 33.3%; и шеста група - умерено присуство код 33.3% и изражено присуство код 66.7% експерименталних животиња.

Код експерименталних животиња жртвованих десетог дана не постоји статистички значајна разлика у присуству фибробласта ($hi\text{-}k\text{-}kvadrat=5.750, DF=3, p=0.124$).



II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Графикон 18. Васкуларизација код експерименталних група животиња жртвованих десетог дана

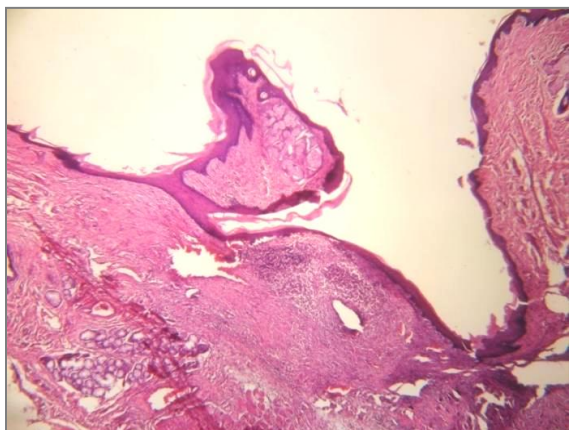
Заступљеност васкуларизације код животиња које су жртвоване десетог дана била је следећа: друга група - благо присуство код 100%; трећа група - благо код 50% и умерено присуство код 50%; пета група - није присутно код 16.7%, благо присуство код 83.3%; и шеста група - благо код 66.7% и умерено присуство код 33.3% експерименталних животиња.

Код експерименталних животиња жртвованих десетог дана не постоји статистички значајна разлика у васкуларизацији ($hi\text{-}kvadrat=7.213$, $DF=3$, $p=0.065$).

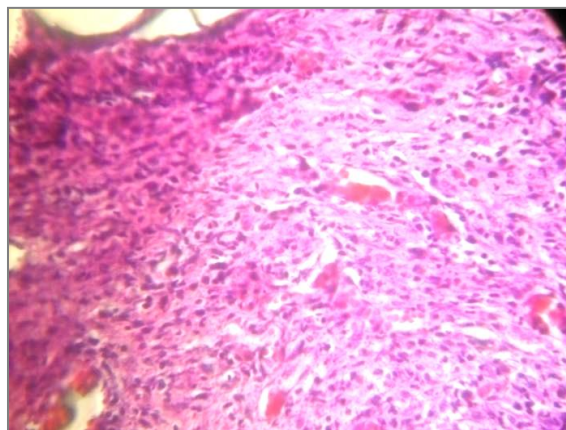
- Патохистолошки налаз ткива животиња жртвованих десетог дана

- Друга група - здраве експерименталне животиње са улцерацијом

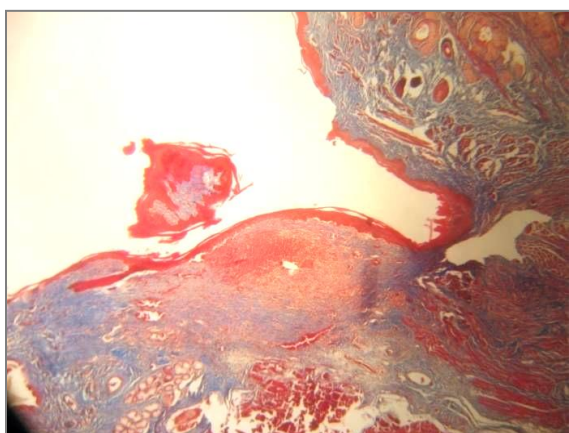
Код експерименталних животиња друге групе, здравих са улцерацијом, које су жртвоване десетог дана, уочава се потпуна реепителизација са израженим фибробластима и благо израженом васкуларизацијом (слике 116-119).



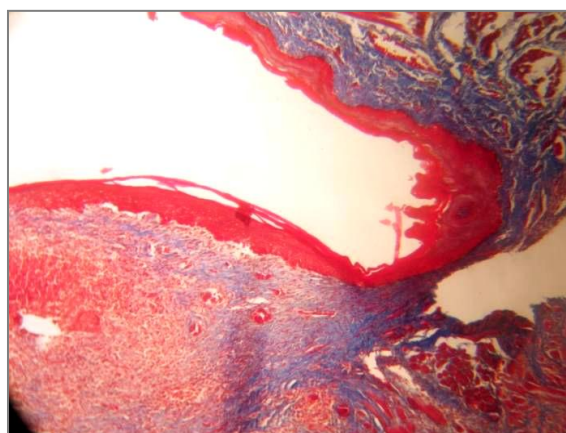
Слика 116. Патохистолошки налаз у II групи животиња жртвованих 10. дана. Потпуна реепителизација са израженим фибробластима (ХЕ, x40).



Слика 117. Детаљ са слике 116. Благо изражена васкуларизација (ХЕ, x400).



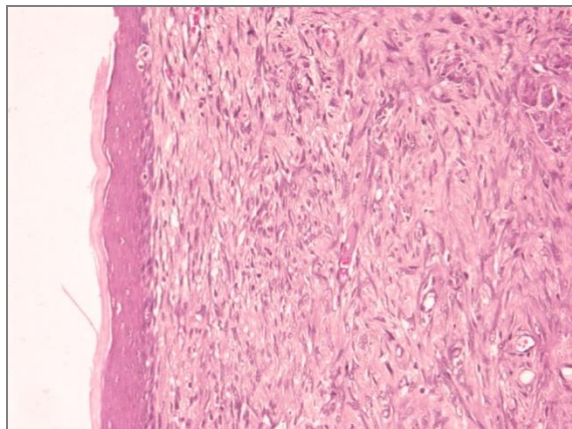
Слика 118. Патохистолошки налаз у II групи животиња жртвованих 10. дана (Masson trichrome, x40).



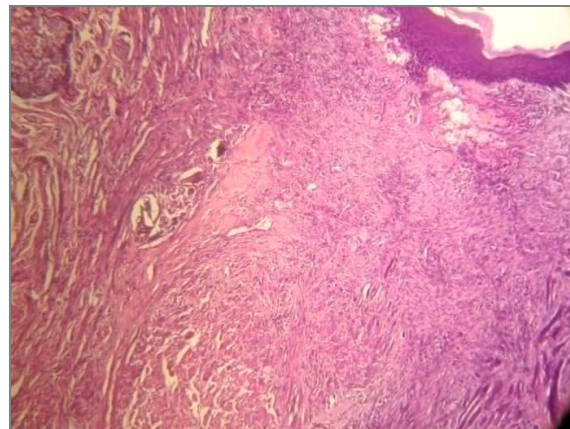
Слика 119. Патохистолошки налаз у II групи животиња жртвованих 10. дана (Masson trichrome, x100).

- **Трећа група - здраве експерименталне животиње са улцерацијом и примењеним ласером**

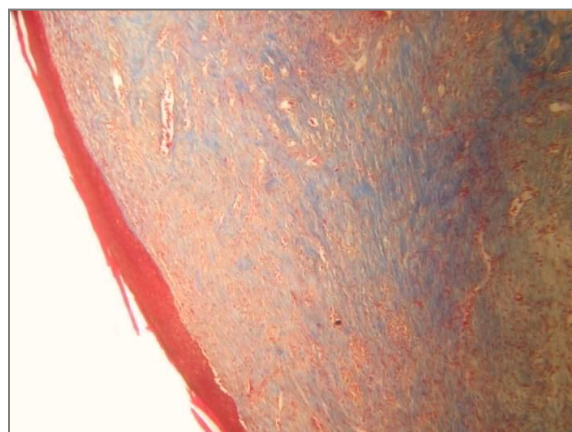
Код експерименталних животиња треће групе, здравих са улцерацијом и примењеним ласером, које су жртвоване десетог дана, патохистолошком анализом уочава се потпуна реепителизација, благо присуство лимфоцита и плазмоцита, благо до умерено изражена васкуларизација, као и веома изражено присуство фибробласта (слике 120-123).



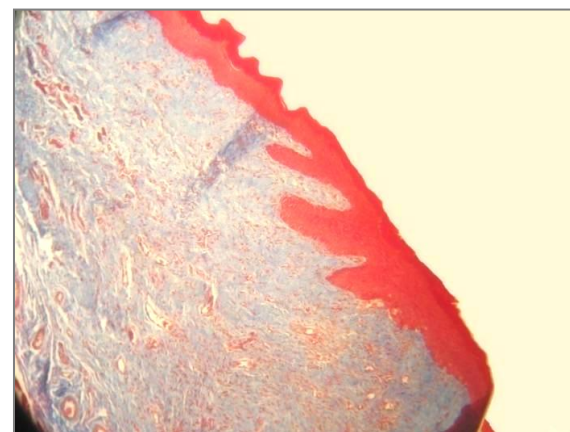
Слика 120. Патохистолошки налаз у III групи животиња жртвованих 10. дана. Потпуна реепителизација (ХЕ, x200).



Слика 121. Патохистолошки налаз у III групи животиња жртвованих 10. дана. Блага инфилтрација лимфоцитима и плазмоцитима (ХЕ, x100).



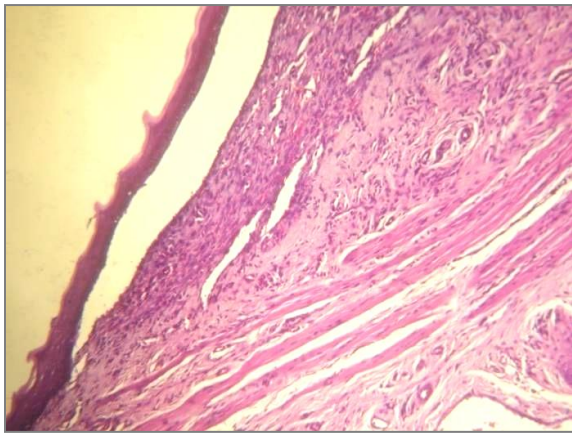
Слика 122. Патохистолошки налаз у III групи животиња жртвованих 10. дана (Masson trichrome, x100).



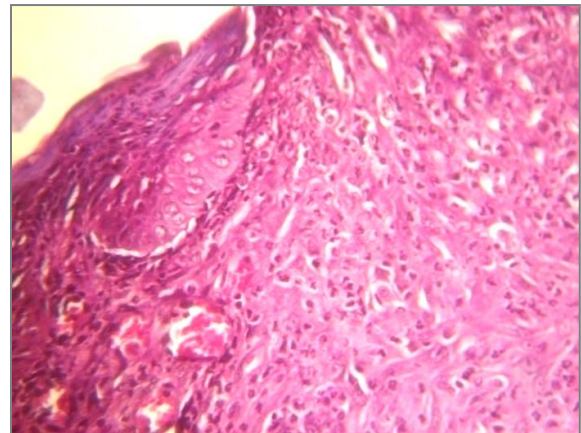
Слика 123. Патохистолошки налаз у III групи животиња жртвованих 10. дана (Masson trichrome, x100).

- Пета група - животиње са индукованим дијабетесом и улцерацијом

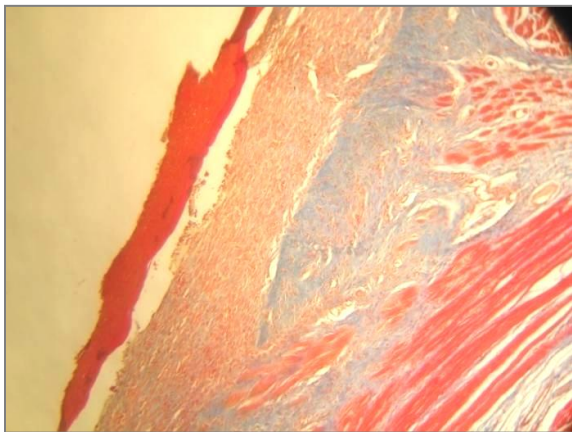
Код пете групе експерименталних животиња, дијабетичних са улцерацијом, које су жртвоване десетог дана, патохистолошком анализом уочава се почетак реепителизације, са заравњеном новоствореном мукозом и умерено присутним лимфоцитима, плазмоцитима, фибробластима као и благо изражена васкуларизација (слике 124-127).



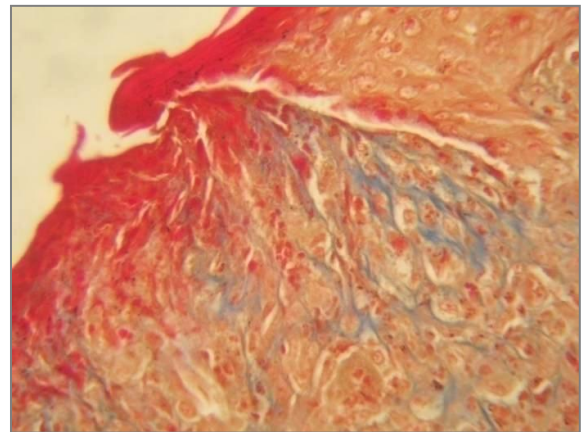
Слика 124. Патохистолошки налаз у V групи животиња жртвованих 10. дана. Танка мукоза, изражени фибробласти и благо изражена васкуларизација (ХЕ, x100).



Слика 125. Патохистолошки налаз у V групи животиња жртвованих 10. дана. Почетак реепителизације, умерено присутни лимфоцити и плазмоцити (ХЕ, x400).



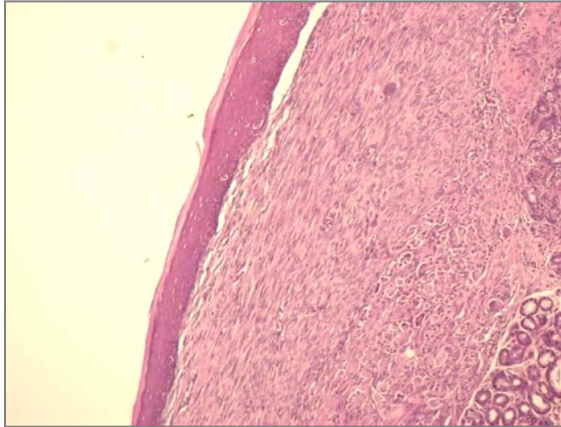
Слика 126. Патохистолошки налаз у V групи животиња жртвованих 10. дана (Masson trichrome, x100).



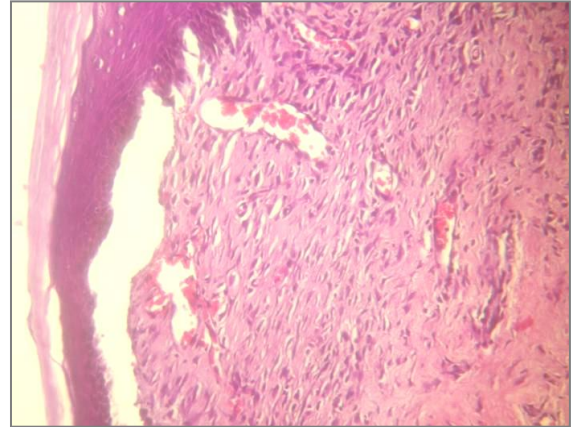
Слика 127. Патохистолошки налаз у V групи животиња жртвованих 10. дана (Masson trichrome, x400).

- **Шеста група - животиње са индукованим дијабетесом, улцерацијом и примењеним ласером**

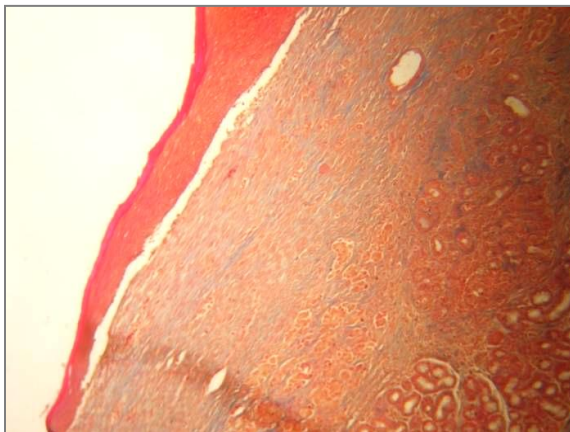
Код експерименталних животиња шесте групе, дијабетичних са улцерацијом и примењеним ласером, које су жртвоване десетог дана, патохистолошком анализом уочава се потпуна реепителизација, умерено до изражено присуство фибробласта и благо до умерено изражена васкуларизација (слике 128-131).



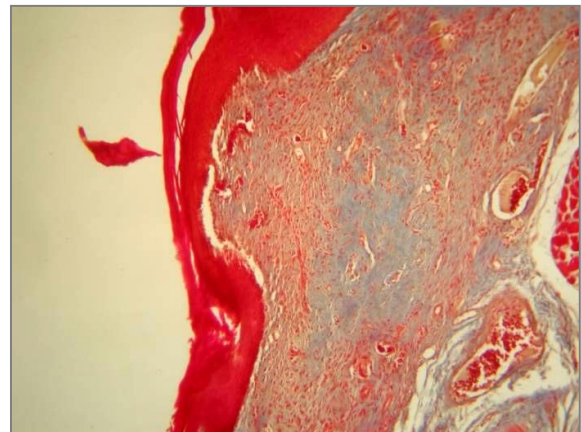
Слика 128. Патохистолошки налаз у VI групи животиња жртвованих 10. дана. Изражени фибробласти и благо изражена васкуларизација (ХЕ, x100).



Слика 129. Патохистолошки налаз у VI групи животиња жртвованих 10. дана. Попуна реепителизација, умерено присуство фибробласта и васкуларизације (ХЕ, x200).



Слика 130. Патохистолошки налаз у VI групи животиња жртвованих 10. дана (Masson trichrome, x100).



Слика 131. Патохистолошки налаз у VI групи животиња жртвованих 10. дана (Masson trichrome, x100).

6.2.5. Вредности VEGF у ткиву

Вредности VEGF у ткиву одређиване су комерцијалном квантитативном методом сендвич ензим имуноесеј техником (ELISA test). Добијене вредности су изражене у односу на mg протеина у супернатанту хомогената. Резултати су приказани табеларно.

Табела 11. Вредности VEGF у ткиву животиња жртвованих трећег дана

Трећи дан жртвовања							p
Група	Број	\bar{x}	SD	Med	Min	Max	
II група	6	4.61	1.54	4.73	2.84	6.52	<0.001*
III група	6	7.34	0.48	7.47	6.55	7.88	
V група	6	1.87	0.75	1.79	0.90	2.72	
VI група	6	4.77	0.91	4.75	3.76	5.97	

\bar{x} - Аритметичка средина, SD - Стандардна девијација, Med - Медијана, *статистичка значајност

II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Код експерименталних животиња које су жртвоване трећег дана медијана вредности VEGF у II групи износи 4.72 pg/mg (опсег 2.84-6.52), у III групи 7.47 pg/mg (опсег 6.55-7.88), у V групи 1.79 pg/mg (опсег 0.90-2.72) и у VI групи 4.75 pg/mg (опсег 3.76-5.97). Између група експерименталних животиња које су жртвоване трећег дана постоји статистички значајна разлика вредности VEGF ($hi-kvadrat=19.447$, $DF=3$, $p<0.001$) (табела 11).

Разлика медијана VEGF је статистички значајана између експерименталних животиња II и III групе ($p=0.004$), између II и V ($p=0.004$), између III и V ($p=0.004$), између III и VI ($p=0.004$), као и између V и VI ($p=0.004$), али није статистички значајана између II и VI групе експерименталних животиња ($p=0.873$).

Табела 12. Вредности VEGF у ткиву животиња жртвованих седмог дана

Седми дан жртвовања							
Група	Број	\bar{x}	SD	Мед	Min	Max	p
II група	6	3.80	0.92	3.85	2.53	4.89	0.009*
III група	6	4.80	0.91	4.50	3.96	6.31	
V група	6	2.10	1.36	2.17	0.42	3.71	
VI група	6	3.55	0.95	3.70	2.15	4.53	

\bar{x} - Аритметичка средина, SD - Стандардна девијација, Мед - Медијана, *статистичка значајност

II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Код експерименталних животиња које су жртвоване седмог дана медијана вредности VEGF у II групи износи 3.85 pg/mg (опсег 2.53-4.89), у III групи 4.50 pg/mg (опсег 3.96-6.31), у V групи 2.17 pg/mg (опсег 0.42-3.71) и у VI групи 3.70 pg/mg (опсег 2.15-4.53). Између свих група експерименталних животиња које су жртвоване трећи дан постоји статистички значајна разлика вредности VEGF ($hi-kvadrat=11.500$, $DF=3$, $p=0.009$) (табела 12).

Разлика медијана VEGF је статистички значајана између експерименталних животиња II и V групе ($p=0.037$), као и између III и V ($p=0.004$), али није статистички значајана између животиња II и III групе ($p=0.150$), II и VI ($p=0.522$), између III и VI ($p=0.055$), као и између V и VI групе експерименталних животиња ($p=0.055$).

Табела 13. Вредности VEGF у ткиву животиња жртвованих десетог дана

Десети дан жртвовања							
Група	Број	\bar{x}	SD	Мед	Min	Max	p
II група	6	1.42	0.21	1.51	1.13	1.60	0.913
III група	6	1.48	0.21	1.42	1.26	1.80	
V група	6	1.63	0.70	1.73	0.56	2.27	
VI група	6	1.45	0.21	1.47	1.14	1.69	

\bar{x} - Аритметичка средина, SD - Стандардна девијација, Мед - Медијана, *статистичка значајност

II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Код експерименталних животиња које су жртвоване десетог дана медијана вредности VEGF у II групи износи 1.51 pg/mg (опсег 1.13-1.60), у III групи 1.42 pg/mg (опсег 1.26-1.80), у V групи 1.73 pg/mg (опсег 0.56-2.27) и у VI групи 1.47 pg/mg (опсег 1.14-1.69). Између свих група експерименталних животиња које су жртвоване десетог дана не постоји статистички значајна разлика вредности VEGF ($hi-kvadrat=0.527$, $DF=3$, $p=0.913$) (табела 13).

6.2.6. Вредности показатеља оксидационог стреса и антиоксидационе заштите

У истраживању су одређиване вредности Тоталног Оксидационог Статуса (ТОС), Тоталног Антиоксидационог Капацитета (ТАК), индекс оксидационог стреса - ОСИ и каталитичка активност супероксид дизмутазе (СОД). Добијени резултати су приказани табеларно.

Табела 14. Вредности ТОС-а у плазми између група животиња жртвованих трећег дана

ТОС							p
Група	Број	\bar{x}	SD	Med	Min	Max	
I група	6	12.5	2.6	13.1	8.6	15.3	0.001*
II група	6	13.7	4.7	13.7	9.4	17.9	
III група	6	15.2	2.4	15.3	12.6	17.7	
IV група	6	13.4	7.9	13.4	6.2	20.6	
V група	6	22.2	5.9	21.0	16.9	29.7	
VI група	6	2.8	1.1	3.5	1.3	3.5	

\bar{x} - Аритметичка средина, SD - Стандардна девијација, Med - Медијана, *статистичка значајност

I група - здраве животиње

II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

IV група - животиње са индукованим дијабетесом

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Код експерименталних животиња жртвованих трећег дана медијана вредности ТОС-а у I групи износи 13.1 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ еквивалената/L (опсег 8.6-15.3), у II групи 13.7 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ еквивалената/L (опсег 9.4-17.9), у III групи 15.3 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ еквивалената/L (опсег 12.6-17.7), у IV групи 13.4 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ еквивалената/L (опсег 6.2-20.6), у V групи

21.0 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ еквивалената/L (опсег 16.9-29.7) и у VI групи 3.5 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ еквивалената/L (опсег 1.3-3.5). Између свих група експерименталних животиња које су жртвоване трећег дана постоји статистички значајна разлика вредности ТОС-а ($hi\text{-kvadrat}=19.715$, $DF=5$, $p=0.001$) (табела 14).

Разлика медијана ТОС-а је статистички значајана између експерименталних животиња I и V групе ($p=0.004$), између I и VI ($p=0.003$), између II и VI ($p=0.003$), између између III и VI ($p=0.003$), између IV и VI ($p=0.003$) као и између V и VI ($p=0.003$) али није статистички значајана између I и II групе ($p=0.626$), између I и III ($p=0.126$), између I и IV ($p=1.0$), између II и III ($p=1.0$), између II и IV ($p=1.0$), између II и V ($p=0.143$), између III и IV ($p=1.0$), између III и V ($p=0.053$), као и између IV и V групе експерименталних животиња ($p=0.143$).

Табела 15. Вредности ТОС-а у плазми између група животиња жртвованих седмог дана

ТОС							
Група	Број	\bar{x}	SD	Med	Min	Max	p
I група	6	13.5	3.7	13.6	8.6	17.4	0.004*
II група	6	8.5	3.7	7.4	5.4	12.9	
III група	6	13.9	2.3	13.9	11.8	16.1	
IV група	6	13.5	6.6	13.7	6.2	20.6	
V група	6	11.1	1.4	11.5	9.4	12.3	
VI група	6	23.3	6.1	21.7	17.4	30.8	

\bar{x} - Аритметичка средина, SD - Стандардна девијација, Med - Медијана, *статистичка значајност
 I група - здраве животиње
 II група - здраве животиње са улцерацијом
 III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером
 IV група - животиње са индукованим дијабетесом
 V група - дијабетичне са улцерацијом
 VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Код експерименталних животиња жртвованих седмог дана медијана вредности ТОС-а у I групи износи 13.6 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ еквивалената/L (опсег 8.6-17.4), у II групи 7.4 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ еквивалената/L (опсег 5.4-12.9), у III групи 13.9 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ еквивалената/L (опсег 11.8-16.1), у IV групи 13.7 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ еквивалената/L (опсег 6.2-20.6), у V групи 11.5 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ еквивалената/L (опсег 9.4-12.3) и у VI групи 21.7 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ еквивалената/L (опсег 17.4-30.8). Између свих група експерименталних животиња које су жртвоване седмог дана

постоји статистички значајна разлика вредности ТОС-а ($hi\text{-}k\text{-}kvadrat=17.124$, $DF=5$, $p=0.004$) (табела 15).

Разлика медијана ТОС-а је статистички значајана између експерименталних животиња I и VI групе ($p=0.009$), између II и III ($p=0.049$), између II и VI ($p=0.004$), између III и V ($p=0.050$), између III и VI ($p=0.003$), између IV и VI ($p=0.024$) као и између V и VI ($p=0.004$) али није статистички значајана између I и II групе ($p=0.075$), између I и III ($p=1.0$), између I и IV ($p=1.0$), између I и V ($p=0.333$), између II и IV ($p=0.105$), између II и V ($p=0.414$), између III и IV ($p=0.805$), као и између IV и V групе експерименталних животиња ($p=0.747$).

Табела 16. Вредности ТОС-а у плазми између група животиња жртвованих десетог дана

ТОС							p
Група	Број	\bar{x}	SD	Med	Min	Max	
I група	6	12.8	4.4	12.5	8.6	17.4	0.011*
II група	6	5.8	2.0	6.4	3.5	7.5	
III група	6	9.1	3.7	8.2	5.6	13.7	
IV група	6	11.3	5.8	9.6	6.2	19.8	
V група	6	14.9	5.8	14.5	5.9	21.2	
VI група	6	7.2	1.5	8.0	5.4	8.3	

\bar{x} - Аритметичка средина, SD - Стандардна девијација, Med - Медијана, *статистичка значајност

I група - здраве животиње

II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

IV група - животиње са индукованим дијабетесом

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Код експерименталних животиња жртвованих десетог дана медијана вредности ТОС-а у I групи износи $12.5 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ еквивалената/L (опсег 8.6-17.4), у II групи $6.4 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ еквивалената/L (опсег 3.5-7.5), у III групи $8.2 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ еквивалената/L (опсег 5.6-13.7), у IV групи $9.6 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ еквивалената/L (опсег 6.2-19.8), у V групи $14.5 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ еквивалената/L (опсег 5.9-21.2) и у VI групи $8.0 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ еквивалената/L (опсег 5.4-8.3). Између свих група експерименталних животиња које су жртвоване десетог дана постоји статистички значајна разлика вредности ТОС-а ($hi\text{-}k\text{-}kvadrat=14.870$, $DF=5$, $p=0.011$) (табела 16).

Разлика медијана ТОС-а је статистички значајана између експерименталних животиња између I и II групе ($p=0.004$), између I и VI групе ($p=0.004$), између II и V (0.015), као и између V и VI ($p=0.024$) али није статистички значајана I и III ($p=0.107$), између између I и IV ($p=0.422$), између I и V ($p=0.629$), између II и III ($p=0.145$), између II и IV ($p=0.146$), између II и VI ($p=0.072$), између III и IV ($p=0.52$), између III и V ($p=0.053$), између III и VI ($p=0.332$), између IV и V ($p=0.376$) као и између IV и VI експерименталних група животиња ($p=0.334$).

Табела 17. Вредности ТАК у плазми између група животиња жртвованих трећег дана

Група	Број	ТАК					p
		\bar{x}	SD	Med	Min	Max	
I група	6	362.7	182.9	341.1	201.2	698.9	0.004*
II група	6	374.9	51.5	378.3	308.8	460.2	
III група	6	250.1	88.2	204.3	187.2	394.6	
IV група	6	264.5	76.0	253.9	180.9	388.5	
V група	6	407.9	140.2	425.1	162.2	535.0	
VI група	6	614.9	118.9	575.7	455.5	756.6	

\bar{x} - Аритметичка средина, SD - Стандардна девијација, Med - Медијана, *статистичка значајност
 I група - здраве животиње
 II група - здраве животиње са улцерацијом
 III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером
 IV група - животиње са индукованим дијабетесом
 V група - дијабетичне са улцерацијом
 VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Код експерименталних животиња жртвованих трећег дана медијана вредности ТАК у I групи износи $341.1 \mu\text{mol/L FeSO}_4$ еквивалената/L (опсег 201.2-698.9), у II групи $378.3 \mu\text{mol/L FeSO}_4$ еквивалената/L (опсег 308.8-460.2), у III групи $204.3 \mu\text{mol/L FeSO}_4$ еквивалената/L (опсег 187.2-394.6), у IV групи $253.9 \mu\text{mol/L FeSO}_4$ еквивалената/L (опсег 180.9-388.5), у V групи $425.1 \mu\text{mol/L FeSO}_4$ еквивалената/L (опсег 162.2-535.0) и у VI групи $575.7 \mu\text{mol/L FeSO}_4$ еквивалената/L (опсег 455.5-756.6). Између свих група експерименталних животиња које су жртвоване трећег дана постоји статистички значајна разлика вредности ТАК ($hi\text{-kvadrat}=17.582$, $DF=5$, $p=0.004$) (табела 17).

Разлика медијана ТАК је статистички значајана између експерименталних животиња I и VI групе ($p=0.024$), између II и IV ($p=0.037$), између II и VI ($p=0.006$), између III и VI ($p=0.004$), између IV и VI ($p=0.004$) као и између V и VI групе ($p=0.016$),) али није

статистички значајана између I и II групе ($p=0.521$), између I и III ($p=0.146$), између I и IV ($p=0.335$), између I и V ($p=0.422$), између II и III ($p=0.053$), између II и V ($p=0.336$), између III и IV ($p=0.872$), између III и V ($p=0.106$) као и између IV и V групе експерименталних животиња ($p=0.108$).

Табела 18. Вредности ТАК у плазми између група животиња жртвованих седмог дана

Група	Број	ТАК					p
		\bar{x}	SD	Med	Min	Max	
I група	6	343.9	126.5	366.5	201.2	530.4	0.016*
II група	6	424.5	123.0	432.9	299.5	553.8	
III група	6	243.6	96.6	209.0	160.6	396.2	
IV група	6	282.3	120.5	273.7	149.7	496.0	
V група	6	318.0	97.6	296.4	205.9	433.6	
VI група	6	180.4	70.0	179.4	93.6	258.9	

\bar{x} - Аритметичка средина, SD - Стандардна девијација, Med - Медијана, *статистичка значајност

I група - здраве животиње

II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

IV група - животиње са индукованим дијабетесом

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Код експерименталних животиња жртвованих седмог дана медијана вредности ТАК у I групи износи $366.5 \mu\text{mol/L FeSO}_4$ еквивалената/L (опсег 201.2-530.4), у II групи $432.9 \mu\text{mol/L FeSO}_4$ еквивалената/L (опсег 299.5-553.8), у III групи $209.0 \mu\text{mol/L FeSO}_4$ еквивалената/L (опсег 160.6-396.2), у IV групи $273.7 \mu\text{mol/L FeSO}_4$ еквивалената/L (опсег 149.7-496.0), у V групи $296.4 \mu\text{mol/L FeSO}_4$ еквивалената/L (опсег 205.9-433.6) и у VI групи $179.4 \mu\text{mol/L FeSO}_4$ еквивалената/L (опсег 93.6-258.9). Између свих група експерименталних животиња које су жртвоване седмог дана постоји статистички значајна разлика вредности ТАК ($hi\text{-kvadrat}=13.990$, $DF=5$, $p=0.016$) (табела 18).

Разлика медијана ТАК је статистички значајана између експерименталних животиња I и VI групе ($p=0.024$), између II и III ($p=0.037$), између II и IV ($p=0.037$), између II и VI ($p=0.004$), као и између V и VI групе ($p=0.024$), али није статистички значајана између I и II групе ($p=0.520$), између I и III ($p=0.108$), између I и IV ($p=0.261$), између I и V ($p=1.0$), између II и V ($p=0.108$), између III и IV ($p=0.748$), између III и V ($p=0.148$), између III

и VI ($p=0.334$), између IV и V ($p=0.630$) као и између IV и VI групе експерименталних животиња ($p=0.054$).

Табела 19. Вредности ТАК у плазми између група животиња жртвованих десетог дана

ТАК							p
Група	Број	\bar{x}	SD	Med	Min	Max	
I група	6	349.2	186.7	298.4	201.2	698.9	0.011*
II група	6	420.6	88.7	454.7	301.0	496.0	
III група	6	290.1	130.0	241.8	179.4	449.2	
IV група	6	290.0	132.1	241.8	149.7	496.0	
V група	6	408.7	90.3	354.9	346.3	527.3	
VI група	6	191.4	75.4	146.7	138.9	288.6	

\bar{x} - Аритметичка средина, SD - Стандардна девијација, Med - Медијана, *статистичка значајност

I група - здраве животиње

II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

IV група - животиње са индукованим дијабетесом

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Код експерименталних животиња жртвованих десетог дана медијана вредности ТАК у I групи износи 298.4 $\mu\text{mol/L FeSO}_4$ еквивалената/L (опсег 201.2-698.9), у II групи 454.7 $\mu\text{mol/L FeSO}_4$ еквивалената/L (опсег 301.0-496.0), у III групи 241.8 $\mu\text{mol/L FeSO}_4$ еквивалената/L (опсег 179.4-449.2), у IV групи 241.8 $\mu\text{mol/L FeSO}_4$ еквивалената/L (опсег 149.7-496.0), у V групи 354.9 $\mu\text{mol/L FeSO}_4$ еквивалената/L (опсег 346.3-527.3) и у VI групи 146.7 $\mu\text{mol/L FeSO}_4$ еквивалената/L (опсег 138.9-288.6). Између свих група експерименталних животиња које су жртвоване десетог дана постоји статистички значајна разлика вредности ТАК ($hi\text{-kvadrat}=14.910$, $DF=5$, $p=0.011$) (табела 19).

Разлика медијана ТАК је статистички значајана између експерименталних животиња II и VI групе ($p=0.004$), као и између V и VI групе ($p=0.004$), али није статистички значајана између I и II групе ($p=0.148$), између I и III ($p=0.421$), између I и IV ($p=0.748$), између I и V ($p=0.196$), I и VI групе ($p=0.053$), између II и III ($p=0.053$), између II и IV ($p=0.076$), између II и V ($p=0.747$), између III и IV ($p=0.872$), између III и V ($p=0.106$), између III и VI ($p=0.053$), између IV и V ($p=0.107$), као и између IV и VI групе експерименталних животиња ($p=0.107$).

Табела 20. Вредности ОСИ у плазми између група животиња жртвованих трећег дана

ОСИ							
Група	Број	\bar{x}	SD	Med	Min	Max	p
I група	6	47.4	21.8	47.4	12.4	76.3	0.002*
II група	6	35.8	9.7	34.6	24.7	47.2	
III група	6	65.4	15.5	63.6	45.3	86.0	
IV група	6	62.7	41.9	65.4	16.2	114.6	
V група	6	61.4	26.7	49.1	36.7	105.4	
VI група	6	4.9	2.5	6.0	1.8	7.6	

\bar{x} - Аритметичка средина, SD - Стандардна девијација, Med - Медијана, *статистичка значајност

I група - здраве животиње

II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

IV група - животиње са индукованим дијабетесом

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Код експерименталних животиња жртвованих трећег дана медијана вредности ОСИ у I групи износи 47.4 mM/L (опсег 12.4-76.3), у II групи 34.6 mM/L (опсег 24.7-47.2), у III групи 63.6 mM/L (опсег 45.3-86.0), у IV групи 65.4 mM/L (опсег 16.2-114.6), у V групи 49.1 mM/L (опсег 36.7-105.4) и у VI групи 6.0 mM/L (опсег 1.8-7.6). Између свих група експерименталних животиња које су жртвоване трећег дана постоји статистички значајна разлика вредности ОСИ (hi -kvadrat=18.885, DF=5, $p=0.002$) (табела 20).

Разлика медијана ОСИ је статистички значајана између експерименталних животиња I и VI групе ($p=0.004$), између II и III ($p=0.010$), између II и VI ($p=0.004$), између III и VI ($p=0.004$), између IV и VI ($p=0.004$) као и између V и VI групе ($p=0.004$),) али није статистички значајана између I и II групе ($p=0.200$), између I и III ($p=0.109$), између I и IV ($p=0.423$), између I и V ($p=0.522$), између II и IV ($p=0.522$), између II и V ($p=0.055$), између III и IV ($p=1.0$), између III и V ($p=0.552$) као и између IV и V групе експерименталних животиња ($p=0.873$).

Табела 21. Вредности ОСИ у плазми између група животиња жртвованих седмог дана

ОСИ							
Група	Број	\bar{x}	SD	Med	Min	Max	p
I група	6	45.8	25.3	43.2	19.7	87.0	0.001*
II група	6	21.9	11.2	21.0	10.1	37.8	
III група	6	63.1	21.6	57.8	40.2	100.4	
IV група	6	56.1	28.6	53.0	22.9	108.5	
V група	6	38.3	14.0	37.5	21.8	54.8	
VI група	6	152.0	83.7	133.9	66.9	280.0	

\bar{x} - Аритметичка средина, SD - Стандардна девијација, Med - Медијана, *статистичка значајност

I група - здраве животиње

II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

IV група - животиње са индукованим дијабетесом

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Код експерименталних животиња жртвованих седмог дана медијана вредности ОСИ у I групи износи 43.2 mM/L (опсег 19.7-87.0), у II групи 21.0 mM/L (опсег 10.1-37.8), у III групи 57.8 mM/L (опсег 40.2-100.4), у IV групи 53.0 mM/L (опсег 22.9-108.5), у V групи 37.5 mM/L (опсег 21.8-54.8) и у VI групи 133.9 mM/L (опсег 66.9-280.0). Између свих група експерименталних животиња које су жртвоване седмог дана постоји статистички значајна разлика вредности ОСИ ($hi\text{-}kvadrat=20.880$, $DF=5$, $p=0.001$) (табела 21).

Разлика медијана ОСИ је статистички значајана између експерименталних животиња између I и VI ($p=0.010$), између II и III ($p=0.004$), између II и IV ($p=0.016$), између II и VI ($p=0.004$), између III и VI ($p=0.025$), између IV и VI ($p=0.016$) као и између V и VI групе ($p=0.004$), али није статистички значајана, између I и II групе ($p=0.055$), између I и III ($p=0.2$), између I и IV ($p=0.423$), између I и V ($p=0.873$), између II и V ($p=0.078$), између III и IV ($p=0.631$), између III и V ($p=0.055$) као између IV и V групе експерименталних животиња ($p=0.2$).

Табела 22. Вредности ОСИ у плазми између група животиња жртвованих десетог дана

ОСИ							p
Група	Број	\bar{x}	SD	Med	Min	Max	
I група	6	44.2	22.5	41.6	24.9	87.1	0.044*
II група	6	14.3	5.8	13.6	7.1	23.4	
III група	6	41.5	27.2	36.4	12.5	75.9	
IV група	6	49.6	26.2	46.1	12.6	94.4	
V група	6	39.5	19.4	41.3	11.1	60.5	
VI група	6	42.1	16.5	46.8	18.5	57.3	

\bar{x} - Аритметичка средина, SD - Стандардна девијација, Med - Медијана, *статистичка значајност

I група - здраве животиње

II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

IV група - животиње са индукованим дијабетесом

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Код експерименталних животиња жртвованих десетог дана медијана вредности ОСИ у I групи износи 41.6 mM/L (опсег 24.9-87.1), у II групи 13.6mM/L (опсег 7.1-23.4), у III групи 36.4 mM/L (опсег 12.5-75.9), у IV групи 46.1 mM/L (опсег 12.6-94.4), у V групи 41.3 mM/L (опсег 11.1-60.5) и у VI групи 46.8 mM/L (опсег 18.5-57.3). Између свих група експерименталних животиња које су жртвоване десетог дана постоји статистички значајна разлика вредности ОСИ ($hi\text{-}kvadrat=11.429$, $DF=5$, $p=0.044$) (табела 22).

Разлика медијана ОСИ је статистички значајана између експерименталних животиња између I и II групе ($p=0.004$), између II и III ($p=0.037$), између II и IV ($p=0.016$), између II и V ($p=0.025$), између II и VI ($p=0.006$),) али није статистички значајана између I и III ($p=0.631$), између I и IV ($p=0.2$), између I и V ($p=0.748$), између I и VI ($p=0.873$), између III и IV ($p=0.423$), између III и V ($p=0.748$) између III и VI ($p=0.873$), између IV и V ($p=0.423$), између IV и VI ($p=1.0$) као и између V и VI групе експерименталних животиња ($p=0.872$).

Табела 23. Супероксид дисмутаза у плазми између група животиња жртвованих трећег дана

СОД							
Група	Број	\bar{x}	SD	Med	Min	Max	p
I група	6	108.5	7.6	109.5	94.9	115.3	<0.001*
II група	6	111.4	8.5	111.4	98.0	124.8	
III група	6	38.0	8.6	37.3	27.1	47.5	
IV група	6	68.0	20.4	67.1	41.0	101.7	
V група	6	21.3	6.4	21.3	14.2	28.4	
VI група	6	17.0	5.8	17.7	11.1	22.3	

\bar{x} - Аритметичка средина, SD - Стандардна девијација, Med - Медијана, *статистичка значајност

I група - здраве животиње

II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

IV група - животиње са индукованим дијабетесом

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Код експерименталних животиња жртвованих трећег дана медијана вредности СОД у I групи износи 109.5 kU/L (опсег 94.9-115.3), у II групи 111.4 kU/L (опсег 98.0-124.8), у III групи 37.3 kU/L (опсег 27.1-47.5) у IV групи 67.1 kU/L (опсег 41.0-101.7), у V групи 21.3 kU/L (опсег 14.2-28.4) и у VI групи 17.7 kU/L (опсег 11.1-22.3). Између свих група експерименталних животиња које су жртвоване трећег дана постоји статистички значајна разлика вредности СОД (hi-kvadrat=31.553, DF=5, $p < 0.001$) (табела 23).

Разлика медијана СОД је статистички значајана између експерименталних животиња I и III групе ($p=0.004$), између I и IV ($p=0.006$), између I и V ($p=0.004$), између I и VI ($p=0.004$), између II и III ($p=0.003$), између II и IV ($p=0.006$), између II и V ($p=0.003$), између II и VI ($p=0.003$), између III и IV ($p=0.010$), између III и V ($p=0.010$), између III и VI ($p=0.004$), између IV и V ($p=0.004$), као и између IV и VI ($p=0.004$), али није статистички значајана између I и II групе ($p=0.414$) и између V и VI групе експерименталних животиња ($p=0.330$).

Табела 24. Супероксид дисмутаза у плазми између група животиња жртвованих седмог дана

Група	Број	СОД					p
		\bar{x}	SD	Med	Min	Max	
I група	6	109.3	9.1	108.5	94.9	122.1	<0.001*
II група	6	62.4	11.4	62.4	52.0	72.8	
III група	6	58.9	10.7	52.0	52.0	72.8	
IV група	6	67.9	27.7	67.7	41.0	101.7	
V група	6	23.7	7.3	28.4	14.2	28.4	
VI група	6	22.3	6.3	23.7	14.9	28.4	

\bar{x} - Аритметичка средина, SD - Стандардна девијација, Med - Медијана, *статистичка значајност

I група - здраве животиње

II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

IV група - животиње са индукованим дијабетесом

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Код експерименталних животиња жртвованих седмог дана медијана вредности СОД у I групи износи 108.5 kU/L (опсег 94.9-122.1), у II групи 62.4 kU/L (опсег 52.0-72.8), у III групи 52.0 kU/L (опсег 52.0-72.8) у IV групи 67.7 kU/L (опсег 41.0-101.7), у V групи 28.4 kU/L (опсег 14.2-28.4) и у VI групи 23.7 kU/L (опсег 14.9-28.4). Између свих група експерименталних животиња које су жртвоване седмог дана постоји статистички значајна разлика вредности СОД ($hi-kvadrat=29.455$, $DF=5$, $p<0.001$) (табела 24).

Разлика медијана СОД је статистички значајана између експерименталних животиња I и II групе ($p=0.003$), I и III групе ($p=0.003$), између I и IV ($p=0.006$), између I и V ($p=0.003$), између I и VI ($p=0.004$), између II и V ($p=0.003$), између II и VI ($p=0.003$), између III и V ($p=0.003$), између III и VI ($p=0.003$), између IV и V ($p=0.003$), као и између IV и VI ($p=0.004$), али није статистички значајана између II и III групе ($p=0.575$), између II и IV ($p=1.0$), између III и IV ($p=1.0$) као и између V и VI групе експерименталних животиња ($p=0.731$).

Табела 25. Супероксид дисмутаза у плазми између група животиња жртвованих десетог дана

Група	Број	СОД					p
		\bar{x}	SD	Med	Min	Max	
I група	6	107.3	10.9	108.3	94.9	122.1	<0.001*
II група	6	62.4	20.8	62.4	31.2	83.2	
III група	6	55.3	15.7	52.0	31.2	72.8	
IV група	6	65.2	20.3	60.6	40.7	101.7	
V група	6	19.9	6.4	18.3	14.2	27.1	
VI група	6	14.2	4.2	12.1	11.1	19.5	

\bar{x} - Аритметичка средина, SD - Стандардна девијација, Мед - Медијана, *статистичка значајност

I група - здраве животиње

II група - здраве животиње са улцерацијом

III група - здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером

IV група - животиње са индукованим дијабетесом

V група - дијабетичне са улцерацијом

VI група - дијабетичне са улцерацијом и примењеним ласером

Код експерименталних животиња жртвованих десетог дана медијана вредности СОД у I групи износи 108.3 kU/L (опсег 94.9-122.1), у II групи 62.4 kU/L (опсег 31.2-83.2), у III групи 52.0 kU/L (опсег 31.2-72.8), у IV групи 60.6 kU/L (опсег 40.7-101.7), у V групи 18.3 kU/L (опсег 14.2-27.1) и у VI групи 12.1 kU/L (опсег 11.1-19.5). Између свих група експерименталних животиња које су жртвоване десетог дана постоји статистички значајна разлика вредности СОД ($hi\text{-}kvadrat=29.590$, $DF=5$, $p<0.001$) (табела 25).

Разлика медијана СОД је статистички значајана између експерименталних животиња I и II групе ($p=0.004$), I и III групе ($p=0.004$), између I и IV ($p=0.010$), између I и V ($p=0.004$), између I и VI ($p=0.004$), између II и V ($p=0.004$), између II и VI ($p=0.004$), између III и V ($p=0.004$), између III и VI ($p=0.004$), између IV и V ($p=0.004$), између IV и VI ($p=0.004$), као и између V и VI ($p=0.050$), али није статистички значајана између II и III групе ($p=0.365$), између II и IV ($p=0.872$), као и између III и IV групе експерименталних животиња ($p=0.442$).

7. ДИСКУСИЈА

7.1. ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА *IN VITRO* ИСПИТИВАЊА

У првом делу истраживања, у *in vitro* условима, испитиван је утицај различитих доза зрачења на пролиферацију *HeLa* ћелија у култури у два одвојена типа експеримента. Када се упореде два типа експеримента према начину третмана истим дозама истог типа културе ћелија које су култивисане на исти начин, очигледно је да од овог једино различитог фактора зависи разлика у коначном ефекту зрачења. Добијен израженији ефекат на *HeLa* ћелије у случају њиховог третмана преко пластичног дна култивационе плоче може бити последица више фактора. С обзиром да се у третману „одозго“ ласерско зрачење простире кроз пластику, а у третману „одозго“ кроз култивациони медијум, испољене разлике могу бити последице различитих апсорптивности средина кроз које се простире ласерско зрачење (култивациони медијум и пластика), као и рефракције светлости која се јавља на граничним површинама између средина различитих оптичких густина. Један од важних разлога за уочену разлику може бити страна ћелија која је зрачена. У третманима кроз дно култивационе плоче зрачен је базални део ћелија, а у третманима кроз медијум зрачен је апикални део ћелија. Имајући у виду да су у питању епителне ћелије са адхерентном способношћу, сигурно да је за раст ћелија битно са које су стране третиране.

Ћелије су зрачене са три различите дозе 4 J/cm^2 , 8 J/cm^2 и 16 J/cm^2 . У првом типу експеримента када су ћелије зрачене преко апикалног дела утврђено је да доза од 8 J/cm^2 показује благи стимулативни ефекат на тродневни раст *HeLa* ћелија, да је доза од 4 J/cm^2 најприближнија вредностима контроле, а да доза од 16 J/cm^2 показује благи инхибиторни ефекат на тродневни раст *HeLa* ћелија. У другом типу експеримента, када су ћелије зрачене са базалне стране, дозе од 4 J/cm^2 и 8 J/cm^2 показују јачи стимулативни ефекат на *HeLa* ћелије. Највећа примењена доза од 16 J/cm^2 је деловала благо инхибиторно на *HeLa* ћелије, слично као и у претходном типу експеримента, али са израженијим инхибиторним ефектом.

Када су културе зрачене кроз култивациони медијум, уочава се велика полиморфност ћелија на дози од 8 J/cm^2 , односно присутан је значајан број и врло ситних и врло крупних ћелија, што може бити знак велике пролиферативне активности.

У оба типа експеримента мање дозе зрачења имале су стимулативни ефекат на пролиферацију ћелија, док је доза од 16 J/cm^2 показала инхибиторни ефекат. То је у сагласности са резултатима истраживања Hawkins-а и сарадника [170] који указују да кумулативни ефекат мањих доза зрачења (2.5 или 5 J/cm^2) има стимулативни ефекат на пролиферацију хуманих фибробласта коже, док вишеструко излагање већим дозама зрачења (16 J/cm^2) има инхибиторни ефекат на ћелије. Сличне резултате добили су и Houreld и сарадници [171] у свом истраживању у којем су фибробласти узети од дијабетичних животиња зрачени дозом од 5 J/cm^2 показали повећану ћелијску миграцију и пролиферацију, док је код ћелија зрачених дозом од 16 J/cm^2 уочено значајно смањење ћелијске миграције и пролиферације.

Резултати добијени у овом истраживању о повећаној пролиферацији *HeLa* ћелија *in vitro*, као и о бржој регенерацији ледираног епитела пацова, могу се тумачити на више начина. Свакако да је једно од објашњења за могући механизам деловања примењеног ласерског зрачења преко подстицања енергетског метаболизма ћелије. Више аутора су наводили да се ефекти зрачења огледају у повећању потрошње кисеоника у митохондријама и последично у повећаној синтези АТФ-а [130], што је показано и у истраживања која су рађена на *HeLa* ћелијама при дејству ласера мале снаге [172]. Такође, ове промене у енергетици ћелије доводе и до повећане контролисане пропустљивости мембране, што све заједно доводи до повећања опште ћелијске активности.

Повезаност енергетике ћелије са вијабилношћу и растом ћелија под деловањем ласерског зрачења приказано је кроз резултате истраживања више аутора. Тако су Каги и сарадници [173] у свом истраживању зрачили *HeLa* ћелије ласером таласне дужине 632.8 nm и мерили вредност АТФ-а у различитим временским интервалима. На основу добијених резултата закључили су да под утицајем ласера долази до повећане синтезе АТФ-а и да су те вредности зависне од фазе раста ћелијске културе.

Више аутора су као модел за целуларне ефекте ласерског зрачења користили *HeLa* ћелије. Miyamoto и сарадници [128] су делујући ласерским зрачењем на *HeLa* ћелије са

три различите дозе (1, 3 и 5 J/cm²) утврдили дозно зависно смањење вијабилности ћелија, односно да се повећањем дозе зрачења смањује вијабилност ћелија и да се пролиферација ћелија повећава у периоду непосредно након зрачења. Koutná и сарадници [140] су испитивали утицај ласера таласне дужине 830 nm, у континуираном и пулсном моду, као и различите дозе зрачења у опсегу вредности 2-99 J/cm² на пролиферацију *HeLa* ћелија. Пролиферативну активност мерили су на 24, 48, 72 и 96 h. На основу резултата закључили су да ласерски зраци стимулишу пролиферацију *HeLa* ћелија, да је активност статистички значајно већа након 72 и 96 h, и да зрачење у пулсном моду делује стимулативније у односу на континуирани мод зрачења. Yang и сарадници [174] су истраживали утицај ласера на пролиферацију *HeLa* ћелија у различитим временским интервалима, при чему су ћелије биле култивисане у медијумима са различитим концентрацијама фетусног говеђег серума (1%, 2%, 5% и 10%) и под утицајем ласерског зрачења различитих таласних дужина (633 nm, 658 nm и 785 nm). На основу резултата закључили су да је пролиферација ћелија зависна од временског периода након излагања зрачењу, као и од таласне дужине ласерског зрачења, те да је највећа при таласној дужини од 633 nm и у медијуму са концентрацијом фетусног говеђег серума од 10%.

У истраживањима која су рађена на ћелијама при дејству ласера мале снаге нађено је и повећање синтезе РНК и ДНК [175]. Ови подаци о појачаној синтези нуклеинских киселина под дејством ласера су и објашњење могућег механизма за већу пролиферативну и регенеративну ћелијску активност [132]. Синтеза ДНК, односно репликација, је по правилу услов за ћелијску деобу, тако да је појачана репликативна активност ДНК вероватно пут који је довео и до интензивнијих ћелијских деоба. Нешто што може да претходи свему томе је појачана митохондријска активност и активност мембранског транспорта.

У репараторној функцији ласерског зрачења може од посебног значаја бити интензивнија синтеза РНК. Транскрипција је услов за консеквентну синтезу протеина, а утврђена појачана синтеза колегена као последица зрачења може се тумачити као компонента истог ефекта, ако је транскрипциони ефекат укључио појачану транскрипцију специфичних гена за колаген.

Инхибиторни ефекат већих доза зрачења на раст ћелија у култури вероватно се може приписати оштећењима ћелијске мембране и ДНК насталим у оваквом третману. Ово тумачење налази упориште у резултатима истраживања Hawkins-а и Abrahamse-а [176], који су хумане фибробласте коже зрачили различитим дозама (0.5, 2.5, 5, 10 и 16 J/cm²) и показали да доза од 5 J/cm² стимулише митохондријску активност, пролиферацију и миграцију фибробласта, док са друге стране веће дозе зрачења смањују вијабилност и пролиферацију ћелија и доводе до оштећења ћелијске мембране.

Запажен благи цитоксични и антипролиферативни ефекат примењене дозе од 16 J/cm² у овим експериментима, што се види како у резултатима МТТ теста, тако и на микроскопском налазу, могао би бити приписан и токсичном ефекту калцијума. На овако тумачење наводе резултати других истраживања о превеликом ослобађању калцијума након излагања ћелија великим дозама ласерског зрачења [133].

Врло изражене морфолошке промене на ћелијама у испитиваним културама, посебно када је у питању промена облика и плеоморфност ћелија на дозама од 16 J/cm² могу бити објашњене ефектима ове дозе на цитоскелет, као што су то раније забележили неки истраживачи [134]. Са цитираним истраживањем се слажу и налази овог испитивања да се овај ефекат појачава када је изложеност зрачењу дужа. Смањена пролиферативна способност *HeLa* ћелија у овом испитивању нађена при дози од 16 J/cm² такође може бар делом бити приписана ефектима на цитоскелет, а посебно на микротубуле [134], јер су то елементи цитоскелета који граде деобно вретено неопходно за деобу ћелија.

Резултати истраживања су показали да су *HeLa* ћелије метаболички активније под третманом мањим дозама зрачења, од 4 J/cm² и 8 J/cm², а мање активне под третманом дозом од 16 J/cm², без обзира да ли су зрачене са апикалне или базалне стране.

7.2. ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА *IN VIVO* ИСТРАЖИВАЊА

У другом делу истраживања испитиван је утицај ласера мале снаге на зарастање рана здраве и дијабетесом измењене оралне слузокоже. Као експерименталне животиње коришћени су пацови зато што су они погодни за клиничко и хистолошко праћење процеса зарастања рана.

Дијабетес је једно од најчешћих незаразних хроничних обољења које настаје заједничким деловањем генетских фактора, фактора спољашње средине и начина живота. Настаје услед апсолутног или релативног недостатка инсулина, што доводи до поремећаја у метаболизму масти, угљених хидрата и протеина [7, 8, 17].

Дијабетес, као и бројна хронична обољења, затим малигна, неуролошка и друга, може неповољно да утиче на готово сва орална ткива доводећи до појаве различитих промена и симптома у усној дупљи. Такве промене могу да варирају од смањене способности обнављања оралне слузокоже, па до великих оштећења. У току дијабетеса у усној дупљи се јавља гликосијалија и повећана акумулација денталног плака са преваленцом агресивних пародонтопатогена. Убрзано је стварање зубног каменца и смањена отпорност ткива на деловање штетних агенаса који потичу из плака [31]. Јављају се промене на крвним судовима, смањује секреција пљувачке, а самим тим и њено бактерицидно дејство. Поред тога долази до појаве инфламације гингиве, пародонтопатије и ресорпције алвеоларне кости. Може се јавити црвенило и оток језика са атрофијом језичних папила, кандидијаза, печење и жарење, отежано зарастање рана [9, 10].

Пацијенти са дијабетесом приликом прегледа најчешће пријављују одређене симптоме као што су осећај жарења и печења, сувоћа уста, отежано жвакање и говор, промењен укус и немогућност адаптације на мобилне зубне надокнаде [11]. Поред тога код ових пацијената смањује се резилијенција оралне слузокоже, што доводи до поремећаја у ретенцији тоталних зубних протеза. Sennerby и сарадници [177] су у свом истраживању дошли до закључка да је код пацијената са дијабетесом смањена ретенција тоталних зубних протеза у односу на групу пацијената без дијабетеса и то као последица повећане остеокластичне активности коштаног ткива мандибуле и максиле.

Бројни аутори у својим истраживањима проучавали су промене и реакције пародонталних ткива и оралне слузнице на присуство мобилних парцијалних и тоталних зубних надокнада [178]. Посебно место у тим истраживањима заузеле су реакције у виду инфламације и хиперплазије, повећање дубине пародонталних џепова, лабављење зуба и ресорпција алвеоларне кости у најтежим случајевима [179, 180].

Дијабетес повећава могућност настанка ерозија и улцерација оралне слузокоже на местима где је у она контакту са базом зубне протезе [11]. Отежано зарастање рана у усној

дупљи, код оболелих од дијабетеса може да проузрокује бол, инфекцију, непријатност, као и немогућност коришћења протетских надокнада, а самим тим настаје неуспех третмана и потреба за понављањем целокупног терапијског протокола [181].

Бројни истраживачи су у својим истраживањима користили експерименталне животиње како би разјаснили утицај дијабетеса на процес зарастања рана, али и пронашли најбољи терапијски модалитет који би убрзао тај процес.

За индуковање дијабетеса код експерименталних животиња најчешће коришћене хемијске супстанце су алоксан и стрептозотцин [182, 183]. Алоксан се често користи у истраживањима зато што експериментални дијабетес индукован овом супстанцом код животиња доводи до појаве класичних знака дијабетеса као код људи, односно присутни су гликозурија, полифагија, полидипсија и хипергликемија [184].

У овом истраживању коришћен је алоксан у дози од 150 mg/kg телесне тежине што представља дозу која је коришћена и у другим истраживањима процеса зарастања рана код дијабетеса, као и утицаја ласера мале снаге на тај процес [185-188].

У току истраживања праћене су вредности телесне тежине и гликемије код експерименталних животиња.

Праћење вредности телесне тежине животиња указује да на почетку истраживања не постоји статистички значајна разлика између животиња које су одређене као здраве и оних којима је касније дат алоксан ради индуковања дијабетеса (табела 5). Друго мерење телесне тежине, рађено 72 h од давања алоксана, показује постојање статистички значајне разлике између здравих и животиња са индукованим дијабетесом (табела 5). Код трећег мерења телесне тежине експерименталних животиња, четири недеље након давања алоксана а пре прављења улцерација, између здравих и животиња са индукованим дијабетесом такође постоји статистички значајна разлика (табела 5).

Четврто мерење телесне тежине животиња вршено је на дан жртвовања експерименталних животиња. У периоду између трећег и четвртог мерења, код животиња друге, треће, пете и шесте групе, које су жртвоване трећег дана, није дошло до статистички значајне промене телесне тежине, док је код животиња прве и четврте групе постојала статистички значајна разлика (табела 6). Код животиња које су жртвоване седмог дана, у посматраном периоду постоји статистички значајна разлика вредности

телесне тежине код животиња прве, друге, треће и четврте групе, док у истом периоду не постоји статистички значајна разлика код животиња пете и шесте групе (табела 7). Код животиња које су жртвоване десетог дана, постоји статистички значајна разлика вредности телесне тежине код свих група, изузев четврте групе животиња (табела 8).

Добијени резултати показују да је у свим посматраним периодима код животиња којима је дат алоксан дошло до губитка телесне тежине, што је последица развијања дијабетеса и испољавања свих његових симптома. Са друге стране, у истом периоду здраве експерименталне животиње су добијале на телесној тежини. Није запажена промена у телесној тежини као последица настанка улцерације на образној слузокожи животиња као и код примене ласера мале снаге.

Вредности гликемије експерименталних животиња, које су мерене у исто време кад и телесна тежина, показују да не постоји статистички значајна разлика између здравих и животиња којима је касније индукован дијабетес код првог мерења, док код другог, трећег и четвртог мерења, између здравих и животиња са дијабетесом постоји статистички значајна разлика вредности гликемије (табела 9).

На основу ових резултата може се закључити да је алоксан довео до развоја дијабетеса код животиња којима је апликован, што за последицу има трајни пораст вредности гликемије.

У истраживањима процеса зарастања рана најчешће примењивана доза ласера мале снаге је између $1-5 \text{ J/cm}^2$ [159, 163, 189, 190]. Доза која је примењивана у овом истраживању је 6 J/cm^2 , а одређена је као средња вредност две дозе које су показале стимулативни ефекат у делу истраживања на ћелијској култури. Уједно то је и доза коју су и други истраживачи примењивали и која се показала као ефикасна у процесу зарастања рана [191].

Терапија ласером примењивана је на сваки други дан, пре свега због опасности од могућег штетног деловања анестетика на експерименталне животиње у случају свакодневне примене, али и на основу резултата других истраживања ефекта ласера на зарастање рана код дијабетичних животиња, где је показано да управо примена ласера сваког другог дана има благотворно дејство на тај процес [192-194].

Ласери мале снаге користе се у медицини због свог антиинфламаторног дејства, аналгетичког дејства, утицаја на регенерацију нерава, на процес зарастања рана, ремоделовање и стварање коштаног ткива, као и на процес ангиогенезе [150, 195-197].

Бројна су експериментална и клиничка истраживања која указују на позитиван утицај ласера мале снаге на зарастање рана. Најчешће је проучавано зарастање рана на кожи пацова под утицајем ласерског зрачења, док је много мање истраживања која су се бавила зарастањем рана на оралној слузокожи [155, 198-200]. Ране на оралној слузокожи зарастају брже у односу на ране на кожи, и познато је да је то зарастање без или са минималним стварањем ожиљака [80, 201].

Зарастање рана је процес који пролази кроз четири фазе: хемостаза, инфламаторна фаза, пролиферативна фаза и ремоделација оштећеног ткива. Прва фаза, хемостаза, наступа одмах након настанка ране и карактерише се вазоконстрикцијом крвних судова и агрегацијом тромбоцита. Из крвног угрушка и околног ткива ране ослобађају се бројни проинфламаторни цитокини и фактори раста. Друга фаза, инфламаторна, карактерише се доминантним умножавањем неутрофила, макрофага и лимфоцита [89, 90]. Пролиферативна фаза преклапа се са инфламаторном и карактерише се синтезом колагена од стране фибробласта који је кључни елемент у фази зарастања ране. Колаген даје чврстоћу и интегритет ткива. На овај процес надовезују се ангиогенеза, тј. стварање нових крвних судова, контракција и епителизација [90]. На крају следи ремоделовање оштећеног ткива и матурација крвних судова.

Поремећај у зарастању рана код оболелих од дијабетеса може бити последица поремећаја ћелијских и молекуларних сигнала неопходних за нормалан ток зарастања, који подразумева ангиогенезу, формирање гранулационог ткива, епителизацију и ремоделовање оштећеног ткива [57, 202].

Успорен процес зарастање рана на образној слузокожи дијабетичних пацова у поређењу са ранама код здравих животиња повезује се са продуженом инфламаторном фазом упоредо са повећаном васкуларном пермеабилношћу и смањеном ангиогенезом, фиброплазијом и колагенезом [203].

Отежано зарастање рана на оралној слузокожи код дијабетеса може бити повезано и са смањеном експресијом фактора раста који играју значајну улогу у контроли тог

процеса [204]. У раним фазама зарастања рана код дијабетеса смањена је генска експресија и количина васкуларног ендотелног фактора раста, плаценталног фактора раста, кератиноцитног фактора раста, фибробластног фактора раста, инсулину сличаног фактора раста, трансформишућег фактора раста и нервног фактора раста [205].

Посматрањем тока зарастања улцерација резултати добијени у овом истраживању указују да постоји статистички значајна разлика између група експерименталних животиња. Улцерације су најбрже зарастале у групи здравих животиња код којих је примењен ласер мале снаге.

Између група експерименталних животиња које су жртвоване трећег дана постоји статистички значајна разлика аритметичких средина процента зарастања рана (табела 10). Процент зарастања улцерација код животиња жртвованих трећег дана је највећи код здравих животиња код којих је примењен ласер и он износи $38.8 \pm 6.2\%$, док је најмањи код животиња са индукованим дијабетесом и износи $21.9 \pm 7.3\%$.

Између група експерименталних животиња које су жртвоване седмог дана постоји статистички значајна разлика аритметичких средина процента зарастања рана (табела 10). Процент зарастања улцерација код животиња жртвованих седмог дана је, као и код трећег дана, највећи у групи здравих животиња које су ласиране и износи $93.7 \pm 3.8\%$, а најмањи код животиња са дијабетесом и износи $60.7 \pm 10.7\%$.

Између група експерименталних животиња које су жртвоване десетог дана постоји статистички значајна разлика аритметичких средина процента зарастања рана (табела 10). Код здравих животиња које су третиране ласером десетог дана дошло је до потпуног зарастања улцерација, док је код животиња са дијабетесом најмањи проценат зарастања и износи $87.5 \pm 4.7\%$.

Између здравих животиња са улцерацијом и животиња са дијабетесом и улцерацијом код којих је примењен ласер, не постоји статистички значајна разлика у проценту зарастања у свим терминима жртвовања.

Ови резултати су добијени анализом величина улцерација применом компјутерског софтера, *Image J Software* (RSB, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), и показују да је зарастање рана на образној слузокожи успорено код животиња са индукованим дијабетесом у односу на здраве експерименталне животиње. Разлика у

величини улцерације између здравих и дијабетичних животиња је посебно изражена трећег и седмог дана.

Резултати овог истраживања показују и да је зарастање рана брже код животиња код којих је примењен ласер мале снаге у односу на животиње код којих није примењен ласер, и то се односи како на здраве, тако и на животиње са индукованим дијабетесом. На основу тога може се закључити да је примењени ласер испољио биостимулативни ефекат на процес зарастања рана.

Ови резултати су у сагласности са резултатима Al-Watban-а и сарадника [206], као и Yu-а и сарадника [163] који су показали да ласер мале снаге има позитиван утицај на зарастање рана код дијабетичних животиња. Al-Watban и сарадници су на Sprague-Dawley пацовима, здравим и са индукованим дијабетесом, истраживали зарастање рана под утицајем ласера различитих таласних дужина и различитих доза зрачења. Њихови резултати указују да је зарастање рана код здравих животиња било брже него код животиња са индукованим дијабетесом као и да зрачење ласера одговарајућих параметара утиче на тај процес. Yu и сарадници су испитивали ефекат ласерског зрачења на зарастање рана на кожи дијабетичних мишева. Резултати истраживања указују да примена ласера значајно побољшава хистолошки налаз зарастања рана, као и проценат зарастања током времена.

Анализа патохистолошких препарата у овом истраживању вршена је скоровањем параметара од 0 до 3, где је: 0 - одсуство посматраног параметра у препарату; 1 - благо присуство; 2 - умерено и 3 - изражено присуство посматраног параметра у препарату. Анализирано је присуство некрозе, неутрофила, макрофага, лимфоцита, плазмоцита, затим присуство гранулационог ткива, фибробласта и степен васкуларизације.

Некроза је присутна код свих група експерименталних животиња које су жртвоване трећег дана и између група не постоји статистички значајна разлика. Присуство је умерено до изражено у групи животиња са дијабетесом и улцерацијом, умерено у првој групи, односно код здравих експерименталних животиња са улцерацијом, док је код здравих и дијабетичних код којих је примењен ласер некроза благо до умерено присутна. На седми дан некроза је благо присутна само код животиња четврте групе, односно оних са индукованим дијабетесом и улцерацијом.

Овакав налаз наводи на закључак да је код животиња са дијабетесом успорен процес зарастања рана као последица продуженог инфламаторног одговора, али и да ласер мале снаге убрзава тај процес па из тог разлога некроза није нађена на седми дан код животиња са индукованим дијабетесом код којих је примењен ласер.

У литератури се наводи да ласерско зрачење доводи до смањења едема као и броја неутрофила у рани [198].

То је у сагласност и са резултатима овог истраживања јер је анализом патохистолошких препарата утврђено да су неутрофили трећег дана умерено до изражено присутни код свих група експерименталних животиња, али уз мање присуство код животиња које су биле третиране ласером у односу на групе које нису ласиране. Добијене вредности су мање у групи здравих животиња у односу на оне са индукованим дијабетесом. Између група не постоји статистички значајна разлика у њиховом присуству. На седми дан неутрофили су благо присутни само у петој групи животиња, односно животиња са индукованим дијабетесом и улцерацијом. На десети дан није утврђено присуство неутрофила ни у једној групи експерименталних животиња.

Мање присуство неутрофила у рани, као и веће присуство фибробласта, код животиња које су биле изложене ласерском зрачењу, посебно на трећи и седми дан, у сагласности је са резултатима Fahimroug-а и сарадника [207].

Након неутрофила, на месту ране убрзо се јављају и макрофаги. Број макрофага у рани расте како рана зараста и при томе индукују апоптозу и фагоцитозу неутрофила, те на тај начин макрофаги постају доминантне инфламаторне ћелије [208]. Поремећај у функцији макрофага може да доведе до успореног опоравка оштећеног ткива код пацијената са дијабетесом [208, 209].

Ласерско зрачење може да утиче на промену састава запаљенског инфилтрата код дијабетичних рана, утичући на инфилтрацију неутрофила и макрофага, као и на диференцијацију макрофага у рани [210].

Макрофаги су од кључног значаја у процесу зарастања рана и они поред бројних цитокина и регулаторних фактора, ослобађају васкуларни ендотелни фактор раста, фибробластни фактор раста и трансформишући фактор раста $\beta 1$, који су од пресудног значаја за тај процес [211]. Равнотежа неутрофила и макрофага у рани је такође од

изузетног значаја за процес зарастања рана. Наиме, што је већа количина неутрофила у рани, то је већа и количина макрофага који су неопходни за њихово уклањање из ране. Све то води ка појачаном запаљењу у оштећеном ткиву и отежаном зарастању [211].

Резултати приказани у овом истраживању показују да трећег дана између група не постоји статистички значајна разлика у присуству макрофага. Макрофаги су благо до умерено присутни код свих група експерименталних животиња, са нешто израженијим присуством код дијабетичних животиња са улцерацијом. На седми дан макрофаги су, као и неутрофили, присутни само код дијабетичних животиња са улцерацијом, што је такође један од показатеља продужене инфламаторне фазе код ових животиња. На десети дан није утврђено присуство макрофага ни у једној групи експерименталних животиња. Сличне резултате добили су Carvalho и сарадници [186] који су хистолошки и имунохистохемијски испитивали утицај ласерског зрачења на проценат колагена и макрофага у ранама на кожи дијабетичних пацова. Закључили су да је у контролној групи, која није била изложена зрачењу, било више макрофага у односу на зрачену групу, као и да се ефекат ласера огледа у повећању колагена код животиња које су ласиране.

Добијени резултати у овом истраживању могу да се објасне на начин да је под утицајем ласерског зрачења у првим данима након настанка улцерације, дошло до појачаног, али краћег, инфламаторног одговора који је довео до појачане вазодилатације, стварања крвних судова као и убрзавања процеса зарастања рана. Слично објашњење даје и Pereira [212] у свом истраживању утицаја ласера на зарастање рана, где је пратио процес током различитих временских интервала. Резултати указују да је неколико сати након настанка ране појачан инфламаторни одговор у повређеном ткиву које се зрачи у односу на контролу, док је трећег дана забележена мања статистички значајна разлика у акутном инфламаторном одговору између ткива које је било изложено ласерском зрачењу и контроле.

У литератури се наводи и да ласерско зрачење мења инфламаторни одговор у току процеса зарастања рана кроз регулацију пролиферације лимфоцита [213].

Резултати овог истраживања показују да је лимфоцитна инфилтрација израженија код животиња које су биле ласиране у односу на животиње које нису биле третиране ласером, што је посебно изражено седмог дана. На трећи дан није забележено присуство

лимфоцита код експерименталних животиња. Код здравих животиња са улцерацијом и примењеним ласером, седмог дана, доминира умерено присуство лимфоцита, док су код здравих са улцерацијом и дијабетичних животиња са улцерацијом и примењеним ласером, лимфоцити благо до умерено присутни. Код дијабетичних животиња са улцерацијом доминира најмање, благо присуство лимфоцита. На десети дан, за разлику од седмог дана, присуство лимфоцита израженије је код животиња које нису биле изложене деловању ласера, како код здравих тако и оних са индукованим дијабетесом. Код дијабетичних животиња са улцерацијом доминира умерено присуство лимфоцита, код здравих са улцерацијом лимфоцити су благо до умерено присутни, док је код здравих и дијабетичних које су третиране ласером забележено благо присуство лимфоцита.

Присуство плазмоцита у рани слично је као и присуство лимфоцита. На трећи дан плазмоцити нису присутни у анализираним препаратима експерименталних животиња. На седми дан плазмоцита највише има код треће групе, односно здравих са улцерацијом и примењеним ласером, где доминира њихово умерено присуство. Код дијабетичних са улцерацијом и примењеним ласером запажа се благо до умерено присуство плазмоцита, док код здравих са улцерацијом и дијабетичних са улцерацијом доминира њихово благо присуство. На десети дан најизраженије присуство плазмоцита је код дијабетичних животиња са улцерацијом, где доминира умерено присуство. Код здравих са улцерацијом плазмоцити су благо до умерено присутни, док су код здравих са улцерацијом и примењеним ласером и код дијабетичних са улцерацијом и примењеним ласером плазмоцити благо присутни.

Из ових резултата би се могло закључити да ласер мале снаге утиче на акутни инфламаторни одговор и индукује зарастање рана у раној фази, уз смањење количине неутрофила а повећање количине лимфоцита и плазмоцита у рани. То је у сагласности са другим истраживањима [214, 215].

Апсорпција ласерског зрачења одређене таласне дужине од стране ткива побољшава пролиферацију фибробласта и унапређује метаболизам колагена и формирање гранулационог ткива током процеса зарастања рана код дијабетичних пацова [151].

Резултати овог истраживања показују да се младо гранулационо ткиво јавља у раној фази зарастања улцерација, и тај се процес преклапа са инфламаторном фазом. Већ

трећег дана младо гранулационо ткиво је присутно код свих група животиња и не постоји статистички значајна разлика између група. На седми дан младо гранулационо ткиво је присутно још само код здравих и дијабетичних животиња са улцерацијом, док је код група које су зрачене замењено зрелим везивним ткивом. На десети дан није нађено младо гранулационо ткиво ни у једној групи експерименталних животиња, већ само мноштво фибробласта и зрело везивно ткиво. Сличне резултате добили су Мајуа и сарадници [216] који су третирали ране на кожи дијабетичних пацова *He-Ne* ласером таласне дужине 632.8 nm и у дозама од 3-9 J/cm², пет пута недељно све до потпуног зарастања рана. Њихови резултати указују на повећану продукцију гранулационог ткива код животиња које су зрачене дозама од 4-5 J/cm², што је посебно изражено петог дана од почетка третмана.

Резултати добијени у овом истраживању показују и да је код животиња које су излагане ласерском зрачењу израженије присуство фибробласта у раној фази зарастања у односу на групе које нису ласиране. На трећи дан фибробласти су присутни само код треће и шесте групе експерименталних животиња, односно здравих са улцерацијом и примењеним ласером и код дијабетичних са улцерацијом и примењеним ласером. Управо ова ранија појава фибробласта код група које су биле изложене зрачењу може бити једно од објашњења за брже зарастање рана код ових животиња. Присуство фибробласта је израженије код здравих животиња у односу на оне са дијабетесом.

На седми дан фибробласти су присутни код свих група експерименталних животиња, и у већој количини у односу на трећи дан. Присуство фибробласта је најизраженије код здравих са улцерацијом и примењеним ласером. Код друге и шесте групе експерименталних животиња, односно здравих са улцерацијом и дијабетичних са улцерацијом и примењеним ласером, не постоји разлика у присуству фибробласта, они су умерено до изражено присутни. Најмање присуство фибробласта седмог дана је код дијабетичних животиња са улцерацијом, где доминира њихово умерено присуство. На десети дан добијени су слични резултати као седмог дана са нешто израженијим присуством фибробласта код свих група експерименталних животиња.

Мање присуство фибробласта код животиња са индукованим дијабетесом у односу на здраве животиње може да се објасни на неколико начина. Desta и сарадници [217] су понудили објашњење да дијабетес може да доведе до смањења броја фибробласта због

повећане апоптозе и смањене пролиферације, од којих оба могу узрокована повећаном активацијом транскрипционог фактора *FOXO1*. Поред тога, поједини аутори наводе да је код фибробласта изолованих из коже дијабетичних мишева, за разлику од оних изолованих из здравих животиња, присутна поремећена и успорена миграција и пролиферација, чак и кад се налазе у строго контролисаним *in vitro* условима [218]. На овај начин они су понудили објашњење за каснију појаву и смањен број фибробласта код дијабетичних животиња у односу на здраве.

Веће присуство фибробласта код животиња које су изложене ласерском зрачењу у сагласности је са резултатима истраживања Sardari-ја и сарадника [189], који су показали да ласери мале снаге делују стимулативно на пролиферацију фибробласта и имају позитиван утицај на зарастање рана на оралној слузокожи.

Ангиогенеза је од изузетног значај током процеса зарастања рана јер обезбеђује подручје ране неопходним хранљивим материјама и кисеоником и поспешује стварање гранулативног ткива [57, 219]. Процес ангиогенезе укључује неколико фаза, које су делимично или потпуно регулисане утицајем ангиогених фактора. Прво долази до деградације базалне мембране од стране металопроотеиназа, а затим до миграције ендотелних ћелија које пролиферишу и формирају цевасте структуре које се повезују са постојећим крвним судовима. Пролиферација ендотелних ћелија одвија се углавном под утицајем различитих фактора раста [220].

Ласерско зрачење има позитиван утицај на ангиогенезу, експресију фактора раста и депозицију колагена [221].

Резултати овог истраживања показују да постоји разлика у васкуларизацији између група које су зрачене и оних које нису биле изложене деловању ласерског зрачења. То је посебно изражено на трећи дан када постоји статистички значајна разлика у васкуларизацији између група експерименталних животиња. Васкуларизација је најзаступљенија код треће групе експерименталних животиња, здравих са улцерацијом и примењеним ласером, где доминира умерена до изражена васкуларизација. Код шесте групе, дијабетичних са улцерацијом и примењеним ласером, преовладава умерена васкуларизација, док је код друге и пете групе, здравих са улцерацијом и дијабетичних са улцерацијом, присутна блага васкуларизација. На седми дан између група не постоји

статистички значајна разлика у васкуларизацији. Васкуларизација је највише заступљена код треће групе, благо до умерено, док је код осталих група благо присутна. На десети дан, такође, не постоји статистички значајна разлика у васкуларизацији између група експерименталних животиња. Васкуларизација је највише заступљена код треће групе, здравих са улцерацијом и примењеним ласером, затим код шесте групе, дијабетичних са улцерацијом и примењеним ласером, па код здравих са улцерацијом и најмање код пете групе, дијабетичних са улцерацијом. Из резултата се види да је у свим терминима жртвовања васкуларизација више заступљена код здравих експерименталних животиња у односу на животиње са индукованим дијабетесом.

Поједини аутори наводе да је код дијабетеса смањен број ендотелних прогениторних ћелија, као и да је поремећена функција ових ћелија у вези са бројним васкуларним компликацијама код оболелих [222]. Управо ови наводи могу да дају објашњење за смањену васкуларизацију и поремећено зарастање улцерација код животиња са индукованим дијабетесом у односу на здраве експерименталне животиње. Са друге стране, боља васкуларизација код животиња које су зрачене може се повезати са повећаном ендотелном пролиферацијом под утицајем ласерског зрачења. Ово објашњење подржавају резултати истраживања Schindl-а и сарадника [223] који су испитивали стимулативни ефекат ласера мале снаге на хумане ендотелне ћелије. Они су ћелије зрачили диодним ласером два различитим дозама од 2 J/cm^2 и 8 J/cm^2 , сваког другог дана у периоду од 6 дана. На основу резултата закључили су да ласер мале снаге утиче на пролиферацију ендотелних ћелија, ангиогенезу и да убрзава процес зарастања рана.

Резултати овог истраживања у сагласности су и са резултатима истраживања других аутора. Santos и сарадници [224] су зрачили режњеве на кожи Wistar пацова са индукованим дијабетесом, и то ласерима различите таласне дужине, 680 и 790 nm, у дози од 2.5 J/cm^2 по тачки. Њихови резултати показују да је код пацова код којих је примењен ласер ангиогенеза повећана у односу на контролу (пацови који нису зрачени), и то више при таласној дужини од 790 nm. Ozturan и сарадници [225] су испитивали ефекат терапије ласером на циркулацију непчане слузокоже након примене два диодна ласера различитих таласних дужина и закључили да оба ласера утичу на значајно повећање циркулације након апликације.

Сви посматрани патохистолошки параметри, наведени у овом истраживању, указују да је код животиња са дијабетесом процес зарастања улцерација успорен у односу на здраве експерименталне животиње. Код здравих животиња са улцерацијом и примењеним ласером ране су зарасле на десети дан, за разлику од осталих група животиња. Зарастање је најспорије код експерименталних животиња пете групе, односно дијабетичних са улцерацијом. Код њих је на седми дан запажено присуство акутних знака запаљења, неутрофила и макрофага, док су код осталих група група они замењени хроничним инфилтратом, посматрано кроз присуство лимфоцита и плазмоцита. Поред продужене инфламаторне фазе, код ових животиња је присутно и касније стварање и сазревање гранулационог ткива као и слабија васкуларизација. Управо ови резултати у сагласности су са свим до сада неведним налазима да је код дијабетеса поремећен процес зарастања улцерација али и да ласерско зрачење убрзава тај процес. На позитиван утицај зрачења на зарастање улцерација, како код здравих животиња тако и код оних са дијабетесом, указује и чињеница да добијени резултати анализираних патохистолошких параметара не показују постојање статистички значајне разлике између друге и шесте групе животиња, односно здравих са улцерацијом и дијабетичних са улцерацијом и примењеним ласером.

У литератури се наводи и да ласер мале снаге у процесу зарастања рана утиче на ангиогенезу кроз неколико молекуларних механизма, повећањем експресије хипоксијом индукованог фактора 1 (HIF-1 α) и васкуларног ендотелног фактора раста, као и променом активности матрикс металопротеиназе-2 (MMP-2) [226].

VEGF игра важну улогу у процесу ангиогенезе. Механизам којим VEGF индукује ангиогенезу огледа се у повећаној пермеабилности крвних судова, пролиферацији, миграцији и диференцијацији ендотелних ћелија [227].

О значају VEGF у процесу зарастања рана сведоче резултати бројних истраживања. Szpaderska и сарадници [80] у свом истраживању закључују да је ниво VEGF код оралних рана нижи у односу на ране на кожи током целокупног процеса зарастања рана. Овај фактор је присутан и у пљувачци тако да је његово, али и присуство других фактора, од значаја за зарастање рана у усној дупљи [228]. То потврђују и Keswani и сарадници [83] који су испитивали улогу VEGF из пљувачке на процес зарастања рана на непцу код

мишева. Њихови резултати указују да се након сијалоденектомије и уклањања примарног извора васкуларног ендотелног фактора раста јавља значајно смањење нивоа овог фактора у плувачци, успорена неоваскуларизација и зарастање рана.

Истраживања су показала и да локална апликација VEGF на ране утиче на процес зарастања кроз побољшање хемотаксе и ангиогенезе [229-231]. На то указују Galiano и сарадници [232] у свом истраживању где су показали да локална примена VEGF код генетски дијабетичних *db/db* мишева побољшава неоваскуларизацију у рани кроз стимулацију локалне ангиогенезе.

Различите ћелије које су укључене у процес зарастања рана учествују у ослобађању VEGF. Тромбоцити су прве ћелије које се јављају у рани и ослобађају VEGF, као и неутрофили и макрофаги [97]. Хипоксија која се јавља код оштећења ткива је најјачи индуктор експресије VEGF у ћелијама у рани. У процесу зарастања рана VEGF игра кључну улогу кроз неколико механизма, укључујући неоваскуларизацију, реепителизацију и регулацију депоновања колагена.

Прегледом доступне литературе нису нађени подаци о вредности VEGF у ткиву образне слузокоже здравих пацова и пацова са индукованим дијабетесом након прављења улцерација и излагања ласерском зрачењу.

Резултати добијени у овом истраживању показују да су вредности VEGF у ткиву ране животиња са дијабетесом статистички значајно мање у односу на вредности VEGF у ткиву ране здравих животиња. То је посебно изражено на трећи дан када се вредности VEGF статистички значајно разликују између група експерименталних животиња (табела 11). Највише вредности добијене су код животиња треће групе, односно здравих са улцерацијом и примењеним ласером, док су најмање вредности код животиња пете групе, дијабетичних са улцерацијом. Статистички значајна разлика не постоји једино између друге и шесте групе, односно здравих са улцерацијом и дијабетичних са улцерацијом и примењеним ласером.

На седми дан, код свих група експерименталних животиња вредности VEGF су мање у односу на трећи дан (табела 12). Статистички значајна разлика у вредности VEGF на седми дан постоји једино између животиња друге и пете групе, као и између треће и пете групе, док између осталих група не постоји статистички значајна разлика. Вредности

VEGF су највише код здравих животиња са улцерацијом и примењеним ласером а најмање код дијабетичних са улцерацијом. Вредности VEGF у ткиву се смањују како рана зараста, да би већ десетог дана вредности пале код свих група животиња, тако да не постоји статистички значајна разлика између група (табела 13). Сличне резултате су добили и Altavilla и сарадници [233] који показују да се максимални ниво VEGF у рани достиже између трећег и седмог дана након њеног настанка.

Вредности VEGF код пете групе експерименталних животиња, односно дијабетичних са улцерацијом, остају на готово истом нивоу у току трајања експеримента. У сагласности са овим резултатима јесу и резултати макроскопске и микроскопске анализе рана, где је добијено да су код ових животиња улцерације спорије зарастале и да је на десети дан проценат зарастања код њих најмањи у односу на остале групе. Мање вредности VEGF код ових животиња у односу на здраве животиње, директан су доказ за смањену ангиогенезу и спорију реепителизацију.

Добијене веће вредности VEGF у раној фази зарастања улцерација у сагласности су са резултатима Nogami-ја и сарадника [234]. Они у свом истраживању показују да се VEGF произведен од стране инфламаторних ћелија јавља у раној фази зарастања рана на кожи и индукује васкуларизацију, као и да су те вредности статистички значајно веће првог и трећег дана у односу на контролу.

Чињеница да су у овом истраживању добијене вредности VEGF мање код дијабетичних животиња указује на могућност поремећаја експресије овог фактора у току дијабетеса [235, 236]. На то указују и Thangarajah и сарадници [237] наводећи да је производња VEGF индукована хипоксијом смањена у ћелијама добијеним од пацијената са дијабетесом, као и у исхемијском ткиву животиња са дијабетесом.

У овом истраживању је добијено и да су вредности VEGF веће код животиња које су биле изложене зрачењу у односу на контролу, што указује на позитиван утицај ласерског зрачења на експресију овог фактора у повређеном ткиву [212]. Утицај зрачења на експресију VEGF разматран је и у истраживању Kipshidze-а и сарадника [238], где је показано да ласерско зрачење доводи до повећане продукције VEGF од стране глаткомишићних ћелија, фибробласта и кардиомиоцита, као и да стимулише пролиферацију хуманих ендотелних ћелија у култури. Nakki и сарадници [239] су такође

нашли повећану експресију VEGF под утицајем ласера код хуманих гингивалних фибробласта.

На позитиван утицај зрачења ласера мале снаге на експресију овог фактора и зарастање улцерација указује и налаз у овом истраживању да су улцерације брже зарастале код животиња које се биле ласиране у односу на групе које нису третиране ласером. Бржа реепителизација је праћена и краћом инфламаторном фазом, бржим сазревањем гранулационог ткива као и бољом васкуларизацијом. То је у сагласности са резултатима истраживања које су приказали Kim и сарадници [240].

У овом истраживању проучаван је оксидациони статус у плазми експерименталних животиња кроз одређивање просечних вредности показатеља оксидационог стреса и антиоксидационе заштите. Како би се одредио ниво оксидационог стреса и антиоксидационе заштите код експерименталних животиња одређиване су вредности ТОС, ТАК, ОСИ и активност СОД у плазми. Добијене вредности код животиња друге, треће, пете и шесте групе, односно оних којима су прављене улцерације, као и оних које су поред тога биле изложене ласерском зрачењу, анализирани су у односу на контролне групе животиња, здраве и животиње са индукованим дијабетесом. Разлог за увођење ове две групе животиња је да би се утврдио стваран значај промена код појединих група експерименталних животиња. Наиме, може постојати значајна разлика у овим варијаблама између испитиваних група, а да истовремено вредности не одступају значајно у односу на контролне групе.

Слободни радикали представљају атоме, јоне или молекуле са једним или више неспарених електрона. Ови електрони су одговорни за нестабилност и реактивност свих радикала. Радикали могу да реагују међусобно или са другим молекулима и тако доведу до реакција које за последицу имају оштећење биомолекула и нормалне функције ћелије. Слободни радикали могу да настану у малој количини у процесу ћелијског дисања у митохондријама, затим током инфламаторних процеса у неутрофилима и макрофагама, али и под утицајем егзогенних фактора, токсина, пестицида, затим излагања UV, X и γ -зрачењу [241]. Већину слободних радикала у организму чине реактивне врсте кисеоника.

Реактивне врсте кисеоника (ROS, engl. *reactive oxygen species*) настају на месту повреде и запаљења, и у ниским концентрацијама имају битну улогу јер делују као

сигнални молекули на ћелијску активност. Са друге стране, повећана концентрација ROS уз смањену антиоксидациону заштиту може да доведе до оштећења и смрти ћелије, и тако изазове стање познато као оксидациони стрес [242].

Познато је да у инфламаторној фази процеса зарастања рана ROS секретују у великој количини неутрофили и макрофаги заједно са цитокинима и протеолитичким ензимима. Услед повећане експресије NADPH оксидазе у инфламаторним ћелијама долази до повећане продукције супероксид анјон радикала, који учествују у процесу фагоцитозе и уништавају присутне патогене. Међутим, у већој концентрацији овај радикал доводи до оштећења ткива. У том случају у борбу против слободних радикала ступају антиоксиданси [242].

У циљу процене нивоа продукције слободних радикала у плазми експерименталних животиња, у истраживању су одређиване вредности тоталног оксидационог статуса. Главне компоненте ТОС чине H_2O_2 и липидни хидропероксиди.

Код група здравих експерименталних животиња са улцерацијом и примењеним ласером, које су жртвоване трећег, седмог дана и десетог дана, нису пронађене значајне разлике у вредностима ТОС-а у односу на контролну групу.

Примена ласера код животиња са индукованим дијабетесом и улцерацијом доводи до значајног пада ТОС-а трећег дана, након чега следи пораст седмог дана, да би се десетог дана спустио на ниво контролне групе, али је вредност значајно нижа у односу на групу са нетретираном улцерацијом, односно пету групу експерименталних животиња.

Када се пореде групе дијабетичних и здравих експерименталних животиња, са улцерацијом и применом ласера, уочава се најпре пад ТОС-а трећег дана, пораст седмог дана (и у односу на контролне групе) и враћање на ниво контролних група десетог дана. Вредности ТОС-а остају више у петој групи експерименталних животиња, дијабетичних са улцерацијом, без разлике у односу на контролне групе.

Вредности ТОС-а се статистички значајно не разликују између контролних група животиња, прве и четврте, без обзира на термин жртвовања

Антиоксиданси представљају систем протеина или молекула који се бори против слободних радикала и то чине донирањем електрона, спречавајући на тај начин штетно деловање радикала на ДНК, протеине и липиде [243]. Антиоксиданс је свака супстанца

која одлаже, спречава или отклања оксидационо оштећење циљног молекула [244].

Антиоксидациону заштиту организма чине ензимски и неензимски антиоксиданси. Екстрацелуларна антиоксидациона заштита има улогу да штити површину ћелија са којима је у додиру, као и састојке водене и липидне фазе.

Ензимски антиоксиданси плазме су супероксид дизмутаза, глутатион пероксидаза-3 и каталаза. Улога супероксид дизмутаза се огледа у превођењу слободног радикала супероксида у водоник пероксид. Водоник пероксид не спада у слободне радикале, али је извор настанка хидроксил радикала који оштећује биомолекуле. У плазми постоји активност екстрацелуларне супероксид дизмутаза, док је активност каталазе и глутатион пероксидазе веома ниска. Каталаза уклања водоник пероксид а глутатион пероксидаза-3 липидне пероксиде. Без садејства ових ензима нема ефикасног уклањања производа оксидационог стреса, водоник пероксида и липидних хидропероксида.

Неензимски антиоксиданси плазме су: глутатион, протеинске тиол групе (албумин), аскорбинска киселина, α -токоферол, билирубин и мокраћна киселина. Концентрација сваког од њих не прелази вредност од 1 mmol/l. Заједничко им је да поседују способност редукције оксидованих биомолекула. Наиме, они у реакцији са слободним радикалом врше његову редукцију, при чему се сами оксидују. У прилог томе говоре чињенице да нпр. аскорбинска киселина и глутатион, односно њихови редуковани и оксидовани облици, стварају редокс системе у којима је концентрација редукованих облика и до 1000 пута већа, што им даје изразит антиоксидациони карактер. На основу те њихове особине развијен је *FRAP* тест, који мери редукујућу способност неензимских антиоксиданаса у биолошким течностима.

Сваки од наведених антиоксиданаса може да се мери појединачно и има јединствену улогу у борби против оксидационог стреса, али да би се стекао увид у укупни ниво оксидационог стреса често се приступа мерењу укупног антиоксидационог капацитета. Тај приступ је и примењен у овом истраживању.

У истраживању су одређиване просечне вредности супероксид дизмутаза и тотални антиоксидациони капацитет. Тотални антиоксидациони капацитет је тест којим се одређује тотални антиоксидациони статус.

Резултати овог истраживања показују да присуство улцерације и примена ласера код здравих експерименталних животиња не доводе до промена вредности ТАК у односу на контролну групу.

Посматрањем само група животиња са индукованим дијабетесом запажа се да примена ласера, на трећи дан, доводи до значајног пораста вредности ТАК, како у односу на групу дијабетичних животиња са улцерацијом тако и у односу на контролну групу. На седми и десети дан те вредности падају у односу на групу дијабетичних животиња са улцерацијом, без разлике у односу на контролну групу.

Уколико се упореде трећа и шеста група експерименталних животиња у различитим терминима жртвовања, односно групе здравих и животиња са индукованим дијабетесом које имају улцерацију и код којих је примењен ласер, уочава се да примена ласера код дијабетичних животиња са улцерацијом трећег дана доводи до значајног повећања вредности ТАК у односу на здраве експерименталне животиње. На седми и десети дан вредности ТАК код дијабетичних животиња са улцерацијом и примењеним ласером се враћају на ниво контролних група, тако да не постоји статистички значајна разлика у односу на здраве експерименталне животиње са улцерацијом и примењеним ласером.

У истраживању је однос између ТОС и ТАК изражен кроз индекс оксидационог стреса - ОСИ. Добијени резултати показују да примена ласера у терапији улцерација код здравих експерименталних животиња не доводи до промена вредности ОСИ у односу на контролну групу животиња, у свим терминима жртвовања. Оно што се још издваја од резултата код група здравих експерименталних животиња је да су на десети дан вредности ОСИ значајно ниже код друге групе, односно здравих животиња са улцерацијом, како у односу на трећу групу, животиње које су ласиране, тако и односу на прву, контролну групу.

Када се посматрају животиње са индукованим дијабетесом на трећи дан, уочава се да су вредности ОСИ значајно ниже код животиња шесте групе, дијабетичних са улцерацијом и примењеним ласером, у односу на пету групу, дијабетичне са улцерацијом, као и односу на четврту групу, контролу. На седми дан долази до скока у вредности ОСИ код дијабетичних животиња са улцерацијом и примењеним ласером, па постоји значајна

разлика и у односу на дијабетичне са улцерацијом и односу на контролу. На десети дан вредности ОСИ код дијабетичних животиња са улцерацијом и примењеним ласером враћају се на ниво контроле, те не постоји значајна разлика између група животиња са индукованим дијабетесом.

Када се упореде вредности ОСИ код животиња код којих је примењен ласер, здравих и дијабетичних, запажа се да примена ласера код дијабетичних животиња доводи до значајног пада ОСИ трећег дана, затим до пораста седмог дана, да би се десетог дана вредности вратиле на ниво контролних група.

Оно што се још издваја од резултата, кад се упореде групе здравих и дијабетичних животиња, је да су вредности ОСИ десетог дана значајно ниже код друге групе експерименталних животиња, здравих животиња са улцерацијом, у односу на пету групу животиња, дијабетичне са улцерацијом.

Утврђено је да примена ласера у терапији улцерација код дијабетичних животиња доводи до повећаног оксидационог стреса седмог дана. Повећаном стварању оксиданаса (слободних радикала) се супростављају неензимски антиоксиданси трећег дана, чији пораст изражен повишеним вредностима *FRAP*-а доводи до снижавања оксидационог стреса и концентрације оксиданаса. У периоду од трећег до седмог дана неензимски антиоксиданси се троше у реакцијама са оксидансима, пада им концентрација на ниво контролне групе и постаје недовољна да спречи пораст концентрације оксиданаса и појаву оксидационог стреса. Десетог дана се ниво оксидационог стреса враћа на ниво контролне групе. За разлику од дијабетичних, примена ласера код здравих животиња не изазива значајне промене нивоа оксидационог стреса.

Супероксид дисмутаза је металпротеин који преводи високо реактивни супероксид радикал $O_2^{\cdot -}$ у мање реактивну врсту кисеоника H_2O_2 и молекуларни O_2 . Он се убраја међу ензимске компоненте антиоксидационе заштите и чини прву линију одбране од реактивних врста кисеоника. У зависности од метала који је присутан у активном центру ензима, као и локације у ћелији, разликују се три изоформе СОД-а: супероксид дисмутаза која садржи Cu и Zn (Cu, Zn SOD), супероксид дисмутаза која садржи манган (Mn SOD) и екстрацелуларна супероксид дисмутаза (ЕЦ-СОД).

Екстрацелуларна СОД (ЕЦ-СОД) има већу масу (135kDa) од Cu, Zn SOD, тетрамер је, а свака субјединица садржи по један Cu и Zn [245]. Највећи део екстрацелуларне супероксид дизмутазе (ЕЦ-СОД) стварају и секретују у екстрацелуларну средину фибробласти и глатке мишићне ћелије [246]. ЕЦ-СОД везана за површину ендотелних ћелија представља главни извор плазма ЕЦ-СОД [247]. Утврђено је да се 97-98% ЕЦ-СОД везује за површину ендотелних ћелија, а да се преосталих 2-3% налази у плазми [248]. ЕЦ-СОД на површини ендотелних ћелија штити од прекомерне продукције супероксид анјон радикала [249].

Резултати добијени у овом истраживању показују да су вредности СОД код здравих животиња са улцерацијом и ласером значајно ниже на трећи, седми и десети дан, у односу на контролну групу животиња, односно здраве животиње. Осим тога, на трећи дан запажа се пад активности СОД код треће групе експерименталних животиња, здравих са улцерацијом и примењеним ласером, у односу на другу групу, здраве животиње са улцерацијом. Код друге групе експерименталних животиња, здравих са улцерацијом, значајан пад активности СОД јавља се седмог и десетог дана.

Када се посматрају дијабетичне животиње са улцерацијом и примењеним ласером запажа се значајан пад вредности СОД у односу на контролну групу, дијабетичне животиње, на трећи, седми и десети дан. Осим тога, на десети дан запажа се и значајан пад вредности СОД код шесте групе експерименталних животиња, дијабетичних са улцерацијом и примењеним ласером, у односу на пету групу животиња, дијабетичне са улцерацијом.

Када се упореде контролне групе животиња, здраве животиње и животиње са индукованим дијабетесом, запажа се значајано нижа активност СОД код дијабетичних животиња у односу на здраве експерименталне животиње, и то у свим терминима жртвовања, односно на трећи, седми и десети дан. Утврђена је и значајно нижа активност СОД код дијабетичних животиња са улцерацијом у односу на здраве животиње са улцерацијом у свим терминима жртвовања. Осим тога, утврђена је и значајно нижа активност СОД код дијабетичних животиња са улцерацијом и примењеним ласером у односу на здраве животиње са улцерацијом и примењеним ласером у свим терминима жртвовања.

Изразит пад активности СОД код дијабетичних животиња указује да је ензимска антиоксидациона заштита недовољна да спречи појаву оксидационог стреса. Брзина реакције дизмутације супероксид анјон радикала у водоник пероксид дејством СОД је 3000 пута бржа од спонтане реакције дизмутације, што је чини вероватнијом у условима ин виво [250]. У овом истраживању није одређивана активност других антиоксидационих ензима у плазми, каталазе и глутатион пероксидазе-3, јер подаци из литературе говоре да је активност каталазе у плазми ниска, а да је за испољавање активности глутатион пероксидазе-3 потребна концентрација глутатиона већа од 1 mM/L, што је знатно више од концентрације у плазми која варира у опсегу 4-20 μ M/L [251, 252]. Без садејства три наведена ензима створени продукт водоник пероксид се нагомилава и постаје извор настанка хидроксил радикала. Узимајући ово у обзир, може се претпоставити да пад активности супероксид дизмутаза има заштитни ефекат, јер тада водоник пероксид настаје спонтаном дизмутацијом, реакцијом која се спорије одвија. То је у складу са резултатима добијеним трећег дана код животиња шесте групе, дијабетичних са улцерацијом и ласером, код којих је утврђен снижен ниво оксидационог стреса, праћен порастом концентрације неензимских антиоксиданаса и падом концентрације водоник пероксида и липидних пероксида у плазми. Седмог дана долази до пораста концентрације оксиданаса и нивоа антиоксидационог стреса, праћеног падом неензимске антиоксидационе заштите на ниво контролне групе, док активност СОД остаје нижа. Може се претпоставити да је дошло да накупљања водоник пероксида услед недовољне активности СОД и других антиоксидационих ензима. Активност СОД остаје нижа и десетог дана, када је концентрација неензимских антиоксиданаса на нивоу контролне групе, што говори у прилог томе да у плазми неензимска антиоксидациона заштита има већи значај од ензимске у спречавању и отклањању појаве оксидационог стреса.

Пад активности СОД се најчешће повезује са прекомерном продукцијом водоник пероксида који променом валенце бакра из активног центра ствара услове за настанак хидроксил радикала који оштећују ензим [253]. Пад активности СОД у плазми рефлектује и пад активности фракције везане за зид крвног суда.

С обзиром да резултати добијени у овом истраживању показују да је ласерско зрачење утицало на инфламаторну фазу и количину неутрофила и макрофага у ранама,

може се закључити да је утицало и на стварање слободних радикала, а самим тим и на оксидациони статус.

Сличне резултате добио је и Silveira са сарадницима [117] у истраживању које је имало за циљ да прикаже утицај ласерског зрачења различитих таласних дужина и доза на оксидациони стрес и фиброгенезу у процесу зарастања рана код експерименталних животиња. Резултати су показали да зрачење утиче на процес зарастања рана тако што доводи до смањења величине ране и повећане синтезе колагена. Осим тога, долази до знатног смањења нивоа тиобарбитуратне киселине - реагујуће супстанце (TBARS), као и СОД и каталазе, након деловања зрачења. Овим су указали да је ласер испољио позитиван ефекат на процес зарастања рана и довео до знатног смањења инфламаторног одговора и слободних радикала, а последично и посматраних параметара.

Са друге стране, Firat и сарадници [166] су испитујући утицај ласерског зрачења на зарастање рана на тврдом непцу пацова и тотални оксидациони и тотални антиоксидациони статус у серуму показали да је ласерско зрачење имало позитиван утицај на зарастање рана, и да постоји статистички значајна разлика између група, али што се тиче укупног оксидационог и антиоксидационог статуса није постојала статистички значајна разлика.

8. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата истраживања изведени су следећи закључци:

1. Код зрачења кроз култивациони медијум доза од 8 J/cm^2 показује благи стимулативни ефекат на тродневни раст *HeLa* ћелија, доза од 4 J/cm^2 је најприближнија вредностима контроле, а доза од 16 J/cm^2 показује благи инхибиторни ефекат.
2. Код зрачења кроз дно култивационе плоче дозе од 4 J/cm^2 и 8 J/cm^2 показују стимулативни ефекат на *HeLa* ћелије а највећа примењена доза од 16 J/cm^2 показује благи инхибиторни ефекат.
3. Када је зрачење апликовано кроз дно култивационе плоче дозе од 4 J/cm^2 и 8 J/cm^2 показују јачи стимулативни ефекат, а доза од 16 J/cm^2 показује израженији инхибиторни ефекат у односу на исте дозе апликавања кроз култивациони медијум.
4. Код експерименталних животиња са индукованим дијабетесом дошло је до смањења телесне тежине, а код здравих експерименталних животиња у посматраном периоду дошло је до пораста телесне тежине. Није запажена промена у телесној тежини као последица настанка улцерације на образној слузокожи животиња, нити због примене ласера мале снаге.
5. Алоксан је довео до трајног пораста гликемије са статистички значајном разликом између здравих и дијабетичних животиња.
6. Зарастање рана на образној слузокожи је успорено код животиња са индукованим дијабетесом у односу на здраве експерименталне животиње. Разлика у величини улцерације између здравих и дијабетичних животиња је посебно изражена на трећи и седми дан.
7. Зарастање рана је брже код животиња код којих је примењен ласер мале снаге у односу на животиње код којих није примењен ласер, како код здравих, тако и код животиња са индукованим дијабетесом.
8. Ласер мале снаге убрзава зарастање рана у раној фази.

9. Ласер мале снаге утиче на акутни инфламаторни одговор тако што смањује присуство неутрофила и макрофага, а повећава присуство лимфоцита и плазмоцита у ткиву.
10. Трећег дана не постоји статистички значајна разлика у присуству гранулационог ткива између група. Седмог дана младо гранулационо ткиво је присутно још само код друге и пете групе животиња, које је десетог дана замењено зрелим везивним ткивом.
11. Код животиња које су излагане ласерском зрачењу израженије је присуство фибробласта у раној фази зарастања у односу на групе које нису третиране.
12. Код животиња са индукованим дијабетесом присутна је смањена васкуларизација и поремећено је зарастање улцерација у односу на здраве експерименталне животиње.
13. Примена ласера мале снаге доводи до статистички значајног повећања васкуларизације у раној фази зарастања улцерација.
14. Вредности VEGF у ткиву ране животиња са дијабетесом су статистички значајно мање у односу на вредности VEGF у ткиву ране здравих животиња.
15. Ласер мале снаге утиче на повећање вредности VEGF у ткиву животиња које су биле изложене зрачењу у односу на контролу.
16. Примена ласера у лечењу улцерација оралне слузокоже код здравих животиња не доводи до значајних промена у нивоу оксидационог стреса.
17. Примена ласера у лечењу улцерација оралне слузокоже код дијабетичних животиња доводи до значајних промена у нивоу оксидационог стреса, при чему су промене једнако изражене у односу на одговарајуће групе здравих. Трећег дана је утврђен значајан пад нивоа оксидационог стреса изражен падом вредности индекса оксидационог стреса, што је повезано са значајним порастом тоталног антиоксидационог капацитета и падом тоталног оксидационог статуса. Седмог дана је утврђен значајан пораст нивоа оксидационог стреса израженог порастом вредности индекса оксидационог стреса, што је повезано са значајним порастом тоталног оксидационог статуса. Десетог дана се ниво оксидационог стреса снижава на вредности контролне групе.

18. Улцерација и примена ласера у лечењу улцерација оралне слузокоже код здравих животиња доводе до значајног пада активности супероксид дисмутазе у плазми, а пад се раније јавља у групи третираној ласером.
19. Улцерација и примена ласера у лечењу улцерација оралне слузокоже код дијабетичних животиња доводе до значајног пада активности супероксид дисмутазе у плазми, при чему су промене једнако изражене у односу на одговарајуће групе здравих.

9. ЛИТЕРАТУРА

1. Stanišić-Sinobad D.: Osnovi gnatologije. Beograd, 2001.
2. Manfredini D.: Current Concepts on Temporomandibular Disorders. Berlin: Quintessence Publishing, 2010.
3. Krstić M., Petrović A., Stanišić-Sinobad D., Stošić Z.: Stomatološka protetika- totalna proteza. Velarta, Beograd, 2000.
4. Squier C., Brogden K.: Human Oral Mucosa: Development, Structure and Function. Wiley-Blackwell, 2011.
5. Popović S., Radujković-Kuburović G.: Usna duplja- histologija i embriologija. Akademska misao, Beograd, 2000.
6. Orlov S., Kojović D., Mirković B.: Oralna medicina. Europrint, Niš, 2001.
7. Lalić M. N. Et Al.: Nacionalni vodič dobre kliničke prakse DIABETES MELLITUS. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke Prakse Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Drugo izmenjeno i dopunjeno izdanje, juli 2012
8. The Global Burden of diabetes. Diabetes Atlas. 6th ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2013; 19-26.
9. Lamster IB, Lalla E, Borgnakke WS, Taylor GW. The relationship between oral health and diabetes mellitus. J Am Dent Assoc. 2008; 139:19S-24S. doi:10.14219/jada.archive.2008.0363
10. Saini R, Al-Maweri SA, Saini D, Ismail NM, Ismail AR: Oral mucosal lesions in non oral habit diabetic patients and association of diabetes mellitus with oral precancerous lesions. Diabetes Res Clin Pract. 2010; 89(3):320-6.
11. Cristina de Lima D, Nakata GC, Balducci I, Almeida JD: Oral manifestations of diabetes mellitus in complete denture wearers. J Prosthet Dent. 2008 Jan; 99(1):60-5. doi: 10.1016/S0022-3913(08)60010-4
12. Freitas JB, Gomez RS, De Abreu MH, Ferreira E Ferreira E: Relationship between the use of full dentures and mucosal alterations among elderly Brazilians. J Oral Rehabil. 2008 May; 35(5):370-4. doi:10.1111/j.1365-2842.2007.01782.x.

13. Jovanović G, Burić N, Krunić N.: Biofizika lasera - II deo. *Acta stomatologica Naissi* 2007; 23(55):679-684.
14. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation. The World Health Organization 2006.
15. Sicree R, Shaw JE, Zimmet PZ.: The Global Burden of diabetes. In: Gan D, ed. *Diabetes Atlas*. 4th ed.Brussels: International Diabetes Federation.
16. Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut". Rezultati istraživanja zdravlja stanovništva Srbije 2014. godina. Beograd: Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“; 2015.
17. Sudagani J., Hitman G.A.: Diabetes Mellitus-Etiology and Epidemiology.In *Encyclopedia of Human Nutrition (Second Edition)*, 2005, Pages 535–542.
18. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2013; 36 (Supp. 1): S67-S74 doi: 10.2337/dc13-S067
19. International Diabetes Federation Europe, Primary Care Diabetes Europe. *Diabetes: The Policy Puzzle: Is Europe Making Progress?* 2011.
20. Jovanović-Kesić, Lj.: Komparativno proučavanje promena u parodontalnom džepu dijabetičara tip I-II. Niš: Medicinski fakultet, doktorska disertacija, 1997.
21. Patiño Marín N, Loyola Rodríguez JP, Medina Solis CE, Pontigo Loyola AP, Reyes Macías JF, Ortega Rosado JC, Aradillas García C.: Caries, periodontal disease and tooth loss in patients with diabetes mellitus types 1 and 2. *Acta Odontol Latinoam*. 2008; 21(2):127-33.
22. Bastos AS, Leite AR, Spin-Neto R, Nassar PO, Massucato EM, Orrico SR.: Diabetes mellitus and oral mucosa alterations: prevalence and risk factors. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 Apr; 92(1):100-5. doi:10.1016/j.diabres.2011.01.011.
23. Astor FC, Hanft KL, Ciocon JO.: Xerostomia: a prevalent condition in the elderly. *Ear Nose Throat J* 1999; 78:476-9.
24. Guggenheimer J, Moore PA, Rossie K, Myers D, Mongelluzzo MB, Block HM, et al.: Insulin-dependent diabetes mellitus and oral soft tissue pathologies. I. Prevalence and characteristics of non-candidal lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 89:563–9.

25. Lacopino AM.: Diabetic periodontitis: possible lipid-induced defect in tissue repair through alteration of macrophage phenotype and function. *Oral Dis* 1995; 1:214–29.
26. Collin HL, Niskanen L, Uusitupa M, Toïryy J, Collin P, Koivisto AM, et al.: Oral symptoms and signs in elderly patients with type 2 diabetes mellitus A focus on diabetic neuropathy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 90:299–305.
27. Šehalić M., Knežević M., Tomić S., Gligorijević N., Stolić A.: Stanje parodontcijuma obolelih od bolesti crvene krvne loze. *Praxis Medica*. 2011; 39 (1-2): 43-46
28. Loe H.: Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993;16:329–34
29. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2011; 34(Suppl 1):S62-S69. doi:10.2337/dc11-S062.
30. Vernillo AT.: Dental considerations for the treatment of patients with diabetes mellitus. *JADA* 2003; 134: 24S-33S.
31. Dimitrijević B, Zelić O., Leković V.: *Klinička parodontologija*. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd 2011.
32. Salvi GE, Beck JD, Offenbacher S.: PGE₂, IL-β and TNF-α response in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. 1998, *Ann periodontol* 3 (1): 40-50.
33. Delima A, Oates T, Assuma R, Schwartz Z, Cochran D, Amar S, Graves D.: Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 233–240.
34. Ryan ME, Carnu O, Kamer A.: The influence of diabetes on the periodontal tissues. *JADA* 2003; 134:34S-40S
35. Salvi GE, Yalda B, Collins JG, Jones BH, Smith FW, Arnold RR, Offenbacher S.: Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin dependent diabetes mellitus patients. *J. Periodontal Res.* 1997: 68:127–135.
36. Lalla E, Lamster IB, Feit M et al: Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J. Clin. Invest.* 2000; 105:1117–1124.
37. Vlassara H, Palace MR.: Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med.* 2002 Feb; 251(2):87-101.

38. Đajić D., Đukanović D.: Bolesti usta, Deveto, izmenjeno i dopunjeno izdanje, Univerzitetski udžbenik, Elit – Medica, Beograd 2006.
39. Cicmil S., Stojanović N., Krunić J., Vukotić O., Čakić S.: Periodontal Status in Patients Suffering from Diabetes Mellitus in Relations to Glycosylated Hemoglobin Level and the Level of Oral Hygiene. Serbian Dental Journal, 2010;57(3):129-133. DOI: 10.2298/SGS1003129C
40. Carda C, Carranza M, Arriaga A, Diaz A, Peydro A, Ferraris ME.: Structural differences between alcoholic and diabetic parotid sialosis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2005;10: 309-14.
41. Carda C, Mosquera-Lloreda N, Salom L, Ferraris ME, Peydro A.: Structural and functional salivary disorders in type 2 diabetic patients. Oral Med Path 2010; Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006;11:E309-14.
42. Moore PA, Guggenheimer J, Etzel KR, Weyant RJ, Orchard T.: Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001 Sep; 92(3):281-91.
43. Vernillo AT.: Diabetes mellitus: Relevance to dental treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001; 91: 263-70
44. Obradović RR, Kesić LG, Pejčić AN, Petrović MS, Živković ND, Živković DM.: Diabetes mellitus i oralna kandidoza. Acta stomatologica Naissi 2011; 27(63):1025-1034.
45. Samaranayake L. P., Keung Leung W., Jin L.: Oral mucosal fungal infections. Periodontology 2000. 2009, 49: 39–59. doi: 10.1111/j.1600-0757.2008.00291.x
46. Guggenheimer J, Moore PA, Rossie K et al.: Insulin-dependent diabetes mellitus and oral soft tissue pathologies. II: prevalence and characteristics of Candida and Candidal lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2000; 89(5): 570-576.
47. Daniluk T, Tokajuk G, Stokowska W et al.: Occurrence rate of oral Candida albicans in denture wearer patients. Adv Med Sci. 2006; 51 Suppl 1: 77-80.
48. Ueta E, Osaki T, Yoneda K, Yamamoto T.: Prevalence of diabetes mellitus in odontogenic infections and oral candidiasis: an analysis of neutrophil suppression. J Oral Pathol Med 1993; 22: 168–74.

49. Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola AN.: Diabetes mellitus as a contributory factor in oral candidosis. *Diabet Med* 2006; 23:455-9.
50. Gendreau L, Loewy ZG.: Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont* 2011; 20(4): 251-60.
51. Budtz-Jørgensen, E.: Ecology of Candida-associated Denture Stomatitis. *Microbial Ecology In Health And Disease*.2000; 12 (3). doi:http://dx.doi.org/10.3402/mehd.v12i3.8189.
52. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, Guida A, Petruzzi M, Serpico R.: Candida-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Mar 1; 16 (1):e139-43.
53. Dedić A.: Dijabetes melitus: oralni aspekti. Sarajevo: Stomatološki fakultet, 2004; 135-144.
54. Guo S., Dipietro L.A.: Factors affecting wound healing. *J. Dent. Res.* 2010;89:219-229
55. Mathieu D, Linke J-C, Wattel F.: Non-healing wounds. In: *Handbook on hyperbaric medicine*, Mathieu DE, editor. Netherlands: Springer, 2006; pp. 401-427
56. Huijberts MS, Schaper NC, Schalkwijk CG.: Advanced glycation end products and diabetic foot disease. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008; 24(Suppl 1):S19-S24
57. Brem H, Tomic-Canic M: Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest.* 2007; 117:1219-1222.
58. Jiang X, Ge H, Zhou C, Chai X, Ren QS.: The role of vascular endothelial growth factor in fractional laser resurfacing with the carbon dioxide laser. *Lasers Med Sci.* 2012 May; 27(3):599-606.doi:10.1007/s10103-011 0996-9.
59. Petersen PE.: The world oral health report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century-the approach of the WHO global health programme. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2003; 31
60. Miralles L, Silvestre FJ, Hernández-Mijares A, Bautista D, Llambés F, Grau D.: Dental caries in type 1 diabetics: influence of systemic factors of the disease upon the development of dental caries. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11: E256-60.
61. Jawed M, Shahid SM, Qader SA, Azhar A.: Dental caries in diabetes mellitus: role of salivary flow rate and minerals. *J Diabetes Complications.* 2011 May-Jun; 25(3):183-6. doi:10.1016/j.jdiacomp.2010.07.001.

62. Gurvits GE, Tan A.: Burning mouth syndrome. *World J Gastroenterol* 2013; 19(5):665-672 DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v19.i5.665>
63. Aggarwal A, Panat SR.: Burning mouth syndrome: A diagnostic and therapeutic dilemma. *J Clin Exp Dent*. 2012; 4(3):e180-5.
64. Lopez-Jornet P, Camacho-Alonso F, Andujar-Mateos P, Sanchez-Siles M, Gomez-Garcia F.: Burning mouth syndrome: Update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010;15(4):e562-8.
65. Moore PA, Guggenheimer J, Orchard T.: Burning mouth syndrome and peripheral neuropathy in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*. 2007; 21:397-402.
66. Ship JA, Grushka M, Lipton J, Mott A, Sessle B, Dionne R.: Burning mouth syndrome: an update. *JADA* 1995;126:842-53
67. Minguez-Sanz MP, Salort-Llorca C, Silvestre-Donat FJ.: Etiology of burning mouth syndrome: A review and update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*.2011 Mar 1;16(2):e144-8.
68. Vitkov L., Weitgasser R., Hannig M., Fuchs K., Krautgartner W. D.: Candida-induced stomatopyrosis and its relation to diabetes mellitus. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 2003; 32: 46–50. doi: 10.1034/j.1600-0714.2003.00020.x
69. Šehalić M., Arsić Z., Marjanović D., Đorđević N., Ilić A.: Procena simptoma kod pacijenata sa sindromom pekućih usta primenom verbalno deskriptivne skale. *Peti kongres stomatologa Vojvodine*. Novi Sad, 17-18. Maj 2014.
70. Šehalić M., Đorđević N., Marjanović D., Staletović D., Mitić N.: Oralni lihen planus. *Praxis Medica*. 2014; 43(3): 71-75.
71. Šehalić M., Marjanović D., Djordjević N., Arsić Z.: Frequency and Clinical Manifestation of Patients with Lichen Planus in Kosovska Mitrovica. 19th Congress of the Balkan Stomatological Society – BaSS, April 24-27, 2014, Belgrade, Serbia
72. Grinspan D, Diaz J, Villapol LO et al.: Lichen ruber planus of the buccal mucosa. Its association with diabetes. *Bull Soc Fr Dermatol Syphiligr*. 1966 Dec; 73(6):898-9.
73. Borghelli RF, Pettinari IL, Chuchurru JA, Stirparo MA.: Oral lichen planus in patients with diabetes: An epidemiologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993; 75: 498 - 500.

74. Mikkonen M, Nyysönen V, Paunio I et al.: Prevalence of oral mucosal lesions associated with wearing removable dentures in Finnish adults. *Community Dent Oral Epidemiol* 1984; 12: 191–194.
75. Jainkittivong A, Aneksuk V, Langlais RP.: Oral mucosal conditions in elderly dental patients. *Oral Dis* 2002 Jul;8(4):218-23.
76. Coelho CM, Sousa YT, Dare AM.: Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. *J Oral Rehabil* 2004; 31: 135–13
77. Sarandha DL.: *Textbook of Complete Denture Prosthodontics*, 1st edn. New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2007: 136–137
78. Budtz-Jørgensen E.: Oral mucosal lesions associated with the wearing of removable dentures. *J Oral Pathol* 1981; 10: 65–80
79. Šćepanović Lj., Kojović D.: *Alteracija oralnih tkiva zubnim protezama*. Prosveta, Niš, 1994.
80. Szpaderska AM, Zuckerman JD, DiPietro LA.: Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *Journal of dental research*. 2003 Aug 1; 82(8):621-6.
81. Häkkinen, L., Uitto, V.J., Larjava, H.: Cell biology of gingival wound healing. *Periodontology*, 2000; 24:127–152.
82. Brand HS, Veerman EC.: Saliva and wound healing. *Chin J Dent Res*. 2013; 16(1):7-12.
83. Keswani SG, Balaji S, Le LD, et al.: Role of salivary vascular endothelial growth factor (VEGF) in palatal mucosal wound healing. *Wound Repair Regen*. 2013 Jul-Aug; 21(4):554-62. doi: 10.1111/wrr.12065.
84. Dahlbäck B: Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *J Intern Med*. 2005 Mar; 257(3):209-23.
85. Li J, Chen J, Kirsner R.: Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. 2007 Jan-Feb; 25(1):9-18.
86. Greenhalgh DG.: The role of growth factors in wound healing. *J Trauma* 1996~41(1):159-67

87. Oakley, C., Larjava, H.: Hemostasis, Coagulation and Complications, in Oral Wound Healing (ed H. Larjava), John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, UK. 2012, pp:11-38, doi: 10.1002/9781118704509.ch2
88. Turabelidze A., DiPietro L A: Inflammation and Wound Healing, in Oral Wound Healing (ed H. Larjava), John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, UK., 2012, pp:39-56 doi: 10.1002/9781118704509.ch3
89. Gosain A, DiPietro LA: Aging and wound healing. *World J Surg.* 2004; 28:321-326.
90. Campos AC, Groth AK, Branco AB: Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2008, 11:281-288.
91. Dovi JV, Szpaderska AM, DiPietro LA.: Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury? *Thromb Haemost.* 2004 Aug; 92(2):275-80.
92. Dovi JV, He LK, DiPietro LA.: Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J Leukoc Biol.* 2003 Apr; 73(4):448-55.
93. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, et al.: Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 1998;152:1445
94. Kumar V., Abbas AK., Fausto N., Michell RN.: *Robinsove osnove patologije. Internacionalno izdanje. Osmo izdanje.* Beograd: Datastatus, 2010.
95. Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM.: Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care.* 2012 Jul; 25(7):304-14. doi: 10.1097/01.ASW.0000416006.55218.d0.
96. Polverini, P. J.: Angiogenesis and Wound Healing: Basic Discoveries, Clinical Implications And Therapeutic Opportunities, in Oral Wound Healing (ed H. Larjava), John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, UK., 2012, pp:175-193, doi: 10.1002/9781118704509.ch7
97. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H.: The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res.* 2009; 153:347–58. doi: 10.1016/j.jss.2008.04.023

98. Häkkinen L., Larjava H, Koivisto L.: Granulation Tissue Formation and Remodeling; in Oral Wound Healing: Cell Biology and Clinical Management, First Edition edited by Hannu Larjava, 2012 John Wiley & Sons, Inc. pp:125-175
99. Gottrup F, Storgård Jensen S, Andreasen JO: Wound Healing Subsequent to Injury. In: Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L.: Textbook and Color Atlas of Traumatic Injuries to the Teeth. 4th ed, Blackwell Munksgaard, 2007, pp: 1-66.
100. Johnson KE, Wilgus TA: Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014 Oct 1; 3(10): 647-661.
101. Hennessey P. J., Ford E. G., Black C. T., Andrassy R. J.: Wound collagenase activity correlates directly with collagen glycosylation in diabetic rats, *Journal of Pediatric Surgery*, 1990, vol. 25, no. 1, pp. 75–78
102. Yan SF, Ramasamay R, Schmidt AM.: The Rage Axis. A Fundamental Mechanism Signaling Danger to the Vulnerable Vasculature. *Cir Res* 2010; 106:842-853.
103. Chang PC, Tsai SC, Jheng YH, Lin YF, Chen CC.: Soft-tissue wound healing by anti-advanced glycation end-products agents. *J Dent Res* 2014;93:388–393
104. Ahmed N.: Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005 Jan; 67(1):3-21.
105. Pavlović D., Đorđević V., Kocić G.: Ćelijska signalna transdukcija - modulacija slobodnim radikalima. *Jugoslav. Med. Biohem*. 2002; 21 (2): 69-84
106. Kolluru GK, Bir SC, Kevil CG: Endothelial Dysfunction and Diabetes: Effects on Angiogenesis, Vascular Remodeling, and Wound Healing, *International Journal of Vascular Medicine*, vol. 2012, 2012. doi:10.1155/2012/918267
107. Marrote EJ, Chen D, Hakim JS, Chen AF.: Manganese superoxide dismutase expression in endothelial progenitor cell accelerates wound healing in diabetic mice. *J Clin Invest*. 2010; 120(12): 4207–4219.
108. Spravchikov N., Sizyakov G., Gartsbein M., Accili D., Tennenbaum T., Wertheimer E.: Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications, *Diabetes*, 2001 Jul; 50(7):1627-35

109. Miao M, Niu Y, Xie T, Yuan B, Qing C, Lu S.: Diabetes-impaired wound healing and altered macrophage activation: a possible pathophysiologic correlation. *Wound Repair Regen.* 2012 Mar-Apr; 20(2):203-13. doi: 10.1111/j.1524-475X.2012.00772.x.
110. Xu F, Zhang C, Graves DT.: Abnormal cell responses and role of TNF- α in impaired diabetic wound healing. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:754802. doi: 10.1155/2013/754802.
111. Spanheimer RG, Umpierrez GE, Stumpf V.: Decreased collagen production in diabetic rats. *Diabetes.* 1988 Apr;37(4):371-6.
112. Abiko Y, Selimovic D.: The mechanism of protracted wound healing on oral mucosa in diabetes. Review. *Bosn J Basic Med Sci* 2010; 10: 186–191
113. Nagy A, Nagashima H, Cha S, Oxford GE, Zelles T, Peck AB, Humphreys-Beher MG.: Reduced oral wound healing in the NOD mouse model for type 1 autoimmune diabetes and its reversal by epidermal growth factor supplementation. *Diabetes.* 2001 Sep; 50(9): 2100-4.
114. Atiba A, Ueno H, Uzuka Y.: The effect of aloe vera oral administration on cutaneous wound healing in type 2 diabetic rats. *J Vet Med Sci.* 2011 May; 73(5):583-9.
115. Maiman TH.: Stimulated Optical Radiation in Rubby. *Nature* 1960; 187: 493.
116. Gao X., Xing D.: Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci.* 2009 Jan 12; 16:4. doi: 10.1186/1423-0127-16-4.
117. Silveira PC, Silva LA, Freitas TP, Latini A, Pinho RA.: Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci.* 2011 Jan; 26(1):125-31. doi:10.1007/s10103-010-0839-0.
118. Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M.: Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg.* 2005 Mar; 31(3):334-40.
119. Dalia A. Radwan, Nermeen H. Mohammed, Ahmed A. Zaky.: Effectiveness of Low Power Laser Therapy and Betamethasone in Minimizing Postoperative Edema and Trismus after Third Molar Surgery: a Clinical Trial. *Journal of American Science* 2010;6(12):986-989]. (ISSN: 1545-1003)

120. Garg N., Garg A.: Textbook of Operative Dentistry (3rd Edition). Published by Jaypee Brothers Medical Pub, 2015; pp: 109-114
121. Kirpa J: Fundamentals of Laser Dentistry. Published by Jaypee Brothers Medical Publishers, 2011; pp:1-9
122. Miserendino L.J., Pick R.M.: Lasers in dentistry. Quintessence Publishing Co.Inc., 1995.
123. Jovanović G., Burić N., Krunić N.: Biofizika lasera- I deo. Acta Stomatologica Naissi, decembar/December 2006, vol. 22, broj/number 54
124. Pejčić A, Grujčić D.: Primena lasera male snage u lečenju parodontopatije. Vojnosanit Pregl. 2007 Dec; 64(12):845-50.
125. Houreld NN, Abrahamse H: Cellular Damage in Diabetic Wounded Fibroblast Cells following Phototherapy at 632.8, 830, and 1064 nm. Laser Chemistry. Vol 2007, Article ID 80536, 9 pages doi:10.1155/2007/80536
126. Hamblin M. R., Demidova T. N.: Mechanisms of low level light therapy, *Proc. SPIE* 6140, Mechanisms for Low-Light Therapy, 614001 (February 10, 2006); doi:10.1117/12.646294;
127. Karu TI: Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation. *Photochem Photobiol*, 2008; 84: 1091-1099.
128. Miyamoto Y, Nishikiori D, Hagino F, Wakita M, Tanabe I, Toida M.: Effect of 630-NM pulsed laser irradiation on the proliferation of HeLa cells in Photofrin[®]-mediated photodynamic therapy. *Laser Therapy*. 2011; 20(2):135-138. doi:10.5978/islsm.20.135.
129. Matić M, Lažetić B, Poljački MN, Đuran VD, Ivkov-Simić M.: Lasersko zračenje male snage i njegov uticaj na reparatorne procese kože. *Medicinski pregled*. 2003; 56(3-4):137-141.
130. Silveira PC, Silva LA, Fraga DB, Freitas TP, Streck EL, Pinho R.: Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2009 May 4; 95(2):89-92.doi: 10.1016/j.jphotobiol.2009.01.004.
131. Breitbart H, Levinshal T, Cohen N, Friedmann H, Lubart R.: Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633 nm (HeNe laser). *J Photochem Photobiol B*. 1996 Jul; 34(2-3):117-21

132. Karu T. I.: Primary and secondary mechanisms of the action of monochromatic visible and near infrared radiation on cells, in *The Science of Low-Power Laser Therapy*, T. I. Karu, Ed., pp. 53– 83, Gordon and Breach Science, Amsterdam, The Netherlands, 1998.
133. AlGhamdi K.M., Kumar A., Moussa N.A.: Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci.* Jan 2012; 27(1):237–249 doi: 10.1007/s10103-011-0885-2
134. Sidlova, A., et al.: Laser Light effects on the cytoskeleton of HeLa cells. *Scripta Medica (Brno)*, 2001, 74: 195-208.
135. Karu T.: Effects of visible radiation on cultured cells. *Photochem. Photobiol.*, 52(6), 1089-1099, 1990.
136. Kreisler M, Christoffers AB, Al Haj H, Willershausen B, d'Hoedt B: Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med* 2002, 30(5):365-369
137. Rocha Júnior AM, Oliveira RG, Farias RE, Andrade LCR, Aarestrup FM.: Modulation of fibroblast proliferation and inflammatory response by low-intensity laser therapy in tissue repair process. *An Bras Dermatol.* 2006; 81(2):150-6
138. Wu YH, Wang J, Gong DX, Gu HY, Hu SS, Zhang H.: Effects of low-level laser irradiation on mesenchymal stem cell proliferation: a microarray analysis. *Lasers Med Sci.* 2012 Mar; 27(2):509-19. doi: 10.1007/s10103-011-0995-x.
139. Steinlechner C, Dyson M: The effects of low-level laser therapy on the proliferation of keratinocytes. *Laser Ther* 1993; 5:65–73
140. Koutná M., Janisch R., Veselska R.: Effects of low-power laser irradiation on cell proliferation. *Scripta Medica*, 2003, 76.3: 163-72.
141. Ben-Dov N, Shefer G, Irintchev A, Wernig A, Oron U, Halevy O.: Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Jan 11; 1448(3):372-80.
142. Agaiby, A., Ghali, L., Dyson, M.: Laser modulation of T-lymphocyte proliferation in vitro. *Laser Therapy*, 1998, 10(4): 153-158
143. Dörtbudak O, Haas R, Mallath-Pokorny G.: Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res.* 2000 Dec; 11(6):540-5.

144. Basso FG, Pansani TN, Turrioni AP, Bagnato VS, Hebling J, de Souza Costa CA.: In Vitro Wound Healing Improvement by Low-Level Laser Therapy Application in Cultured Gingival Fibroblasts. *Int J Dent.* 2012; 2012:719452. doi: 10.1155/2012/719452
145. Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 2003; 18(2):95-9.
146. Mirzaei M, Bayat M, Mosafa N, Mohsenifar Z, Piryaee A, Farokhi B, Rezaei F, Sadeghi Y, Rakhshan M. Effect of low-level laser therapy on skin fibroblasts of streptozotocin-diabetic rats. *Photomed Laser Surg.* 2007 Dec; 25(6):519-25.
147. Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, Costa CA: Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci.* 2013 Feb; 28(2):367-74. DOI 10.1007/s10103-012-1057-8
148. Damante C. A., Micheli G. De, Miyagi S. P. H., Feist I. S., Marques M. M.: Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts, *Lasers in Medical Science*, vol. 24, no. 6, pp. 885–891, 2009.
149. Silveira PC, Streck EL, Pinho RA.: Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2007; 86(3):279-82.
150. Pereira CL, Sallum EA, Nociti FH Jr, Moreira RW.: The effect of low-intensity laser therapy on bone healing around titanium implants: a histometric study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009 Jan-Feb; 24(1):47-51.
151. Park JJ, Kang KL.: Effect of 980-nm GaAlAs diode laser irradiation on healing of extraction sockets in streptozotocin-induced diabetic rats: a pilot study. *Lasers Med Sci.* 2012 Jan; 27(1):223-30. doi: 10.1007/s10103-011-0944-8
152. Sharifian Z., Bayat M., Alidoust M., Farahani RM., Bayat M., Rezaie F., Bayat H.: Histological and gene expression analysis of the effects of pulsed low-level laser therapy on wound healing of streptozotocin induced diabetic rats. *Laser Med Sci.* 2014 May; 29(3):1227-35. doi: 10.1007/s10103-013-1500-5
153. Gonçalves RV, Mezêncio JM, Benevides GP, Matta SL, Neves CA, Sarandy MM, Vilela EF.: Effect of gallium-arsenide laser, gallium-aluminum-arsenide laser and healing

- ointment on cutaneous wound healing in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res.* 2010 Apr; 43(4):350-5. doi:10.1590/S0100-879X2010007500022.
154. Busnardo VL, Biondo-Simões ML.: Effects of low-level helium-neon laser on induced wound healing in rats. *Rev Bras Fisioter.* 2010 Jan-Feb; 14(1):45-51.
155. Carvalho PT, Mazzer N, dos Reis FA, Belchior AC, Silva IS.: Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. *Acta Cir Bras.* 2006 May-Jun; 21(3):177-83.
156. Pugliese LS, Medrado AP, Reis SR, Andrade Zde A.: The influence of low-level therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Odontol Bras.* 2003 Oct-Dec; 17(4):307-13
157. Reis, S. R., Medrado, A. P., Marchionni, A. M. T., Figueira, C., Fracassi, L. D., Knop L. A.: Effect of 670-nm laser therapy and dexamethasone on tissue repair: a histological and ultrastructural study. *Photomedicine and laser surgery*, 2008: 26(4), 307-313.
158. Lopes NN, Plapler H, Lalla RV, Chavantes MC, Yoshimura EM, da Silva MA, Alves MT.: Effects of low-level laser therapy on collagen expression and neutrophil infiltrate in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *Lasers Surg Med.* 2010 Aug; 42(6):546-52.
159. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS.: Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. *Wound Repair Regen.* 2001 May-Jun; 9(3):248-55.
160. Walsh L. J.: The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. *Australian Dental Journal* 1997;42(4):247-54
161. Scherer WF, Syverton JT, Gey GO.: Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.*, 1953; 97 (5): 695–710.
162. Cavalcante, Galyléia Meneses, et al.: Experimental model of traumatic ulcer in the cheek mucosa of rats. *Acta Cirurgica Brasileira* 26.3 (2011): 227-234.
163. Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ.: Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. *Lasers Surg Med.* 1997; 20(1):56-63.

164. Hui Ma, Ying-xin Li, Hong-li Chen, Mei-ling Kang, and Timon Cheng-Yi Liu,: Effects of Low-Intensity Laser Irradiation on Wound Healing in Diabetic Rats, *International Journal of Photoenergy*, vol. 2012, Article ID 838496, 7 pages, 2012. doi:10.1155/2012/838496
165. Al-Mobeeriek A.: Effects of myrrh on intra-oral mucosal wounds compared with tetracycline- and chlorhexidine- based mouthwashes. *Clin Cosmet Investig Dent*. 2011 Aug 30; 3: 53-8. doi: 10.2147/CCIDEN.S24064.
166. Firat ET, Dağ A, Günay A, Kaya B, Karadede Mİ, Ersöz Kanay B, Ketani A, Evliyaoğlu O, Uysal E.: The effect of low-level laser therapy on the healing of hard palate mucosa and the oxidative stress status of rats. *J Oral Pathol Med*. 2014 Feb; 43(2):103-10. doi: 10.1111/jop.12106.
167. Erel O.: A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry* 2005; 38: 1103-1111.
168. Benzie FFI, Strain J.: The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytic Biochem* 1996; 239: 70-76.
169. Misra HP, Fridovich I.: The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247(10): 3170-5.
170. Hawkins D, Abrahamse H: Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg*. 2006 Dec; 24(6):705-14.
171. Houreld N, Abrahamse H. Irradiation with a 632.8 nm helium-neon laser with 5 J/cm² stimulates proliferation and expression of interleukin-6 in diabetic wounded fibroblast cells. *Diabetes Technol Ther*. 2007 Oct; 9(5):451-9.
172. Huang YY, Chen C.-H.A, Sharma K.S., Wu Q, Hamblin R. M.: Comparison of cellular responses induced by low level light in different cell types. *Proc. SPIE 7552, Mechanisms for Low-Light Therapy V, 75520A* (February 25, 2010); doi:10.1117/12.841018.
173. Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G.: Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol B*. 1995 Mar; 27(3):219-23.

174. Yang Q. H., Wang H.Y., Chen X. J., et al.: Efficacy of Proliferation of HeLa Cells under Three Different Low-Intensity Red Lasers Irradiation, *International Journal of Photoenergy*, vol. 2012, Article ID 290796, 5 pages, 2012. doi:10.1155/2012/290796.
175. Karu T.I.: Low power laser therapy. In: *Biomedical Photonics Handbook*. Ch. 48, Editor-in-chief Tuan Vo-Dinh, Boca Raton: CRC Press. 2003, pp.48-1-48-25.
176. Hawkins DH, Abrahamse H.: The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers Surg Med*. 2006; 38(1):74-83.
177. Sennerby L, Carlsson GE, Bergman B, Warfvinge J.: Mandibular bone resorption in patients treated with tissue-integrated prostheses and in complete-denture wearers. *Acta Odontol Scand* 1988;46:135-40
178. Bergman B.: Periodontal reactions related to removable partial dentures: a literature review. *J Prosthet Dent* 1987; 58:454-458.
179. Chandler JA, Brudvik JS.: Clinical evaluation of patients eight to nine years after placement of removable partial dentures. *J Prosthet Dent* 1984;51:736-743
180. Zlataric DK, Celebic A, Valentic-Peruzovic M. The effect of removable partial dentures on periodontal health of abutment and non-abutment teeth. *J Periodontol* 2002; 73:137-144.
181. Đorđević N., Ajduković Z., Šehalić M., Marjanović D., Mitić A., Dragojević I., Ilić A.: Diabetes mellitus i oralno zdravlje. *Praxis medica*. 2015; 44(2):67-73
182. Szkudelski T.:The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001; 50(6):537-46.
183. Lenzen S.: The mechanisms of alloxan - and streptozotocin - induced diabetes. *Diabetologia*. 2008 Feb; 51(2):216-26.
184. Leme J.A.C.A., Castellar A., Remedio R.N., Barbosa R.A., Moura L.P., Dalia R.A., Gomes R.J., Caetano F.H., Mello M.A.R., Luciano E.: Effects on short-term of alloxan application to diabetes induction in Wistar rats, *Biosci. J*. 2010; 26:451–456.
185. Neves, L. M. G.; Matheus, R. L.; Santos, G. M. T.; Esquisatto, M. A. M.; Amaral, M. E. C.; Mendonça, F. A. S. Effects of microcurrent application and 670 nm InGaP low-level

- laser irradiation on experimental wound healing in healthy and diabetic Wistar rats. *Laser Phys.* 23 (2013) 035604 (11pp) doi:10.1088/1054-660X/23/3/035604
186. Carvalho Pde T, Silva IS, Reis FA, Perreira DM, Aydos RD.: Influence of ingaalp laser (660nm) on the healing of skin wounds in diabetic rats. *Acta Cir Bras.* 2010 Feb; 25(1):71-9.
187. Diniz SF, Amorim FP, Cavalcante-Neto FF, Bocca AL, Batista AC, Simm GE, Silva TA. Alloxan-induced diabetes delays repair in a rat model of closed tibial fracture. *Braz J Med Biol Res.* 2008 May; 41(5):373-9.
188. Yan H, Peng KJ, Wang QL, Gu ZY, Lu YQ, Zhao J, Xu F, Liu YL, Tang Y, Deng FM, Zhou P, Jin JG, Wang XC.: Effect of pomegranate peel polyphenol gel on cutaneous wound healing in alloxan-induced diabetic rats. *Chin Med J (Engl).* 2013; 126(9):1700-6.
189. Sardari F, Ahrari F.: The effect of low-level helium-neon laser on oral wound healing. *Dent Res J (Isfahan).* 2016 Jan-Feb; 13(1):24-9. doi: 10.4103/1735-3327.174693.
190. Lau P, Bidin N, Krishnan G, AnaybBaleg SM, Sum MB, Bakhtiar H, Nassir Z, Hamid A.: Photobiostimulation effect on diabetic wound at different power density of near infrared laser. *J Photochem Photobiol B.* 2015 Oct; 151:201-7. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.08.009.
191. Campos L, Simões A, Sá PH, Eduardo Cde P: Improvement in quality of life of an oncological patient by laser phototherapy. *Photomed Laser Surg.* 2009 Apr; 27(2):371-4. doi: 10.1089/pho.2008.2300.
192. Güngörmüş M, Akyol UK.: Effect of biostimulation on wound healing in diabetic rats. *Photomed Laser Surg.* 2009 Aug; 27(4):607-10. doi: 10.1089/pho.2008.2349.
193. Kawalec JS, Hetherington VJ, Pfennigwerth TC, Dockery DS, Dolce M.: Effect of a diode laser on wound healing by using diabetic and nondiabetic mice. *J Foot Ankle Surg.* 2004 Jul-Aug; 43(4):214-20.
194. Fırat, E. T., Dağ, A., Günay, A., Kanay, B. E., Ketani, Ş., Ketani, M. A.: Histological examination of the effects of low-level laser therapy on healing of gingiva after gingivectomy in rats. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2013; 27(5), 4137-4140. DOI: 10.5504/BBEQ.2013.0039

195. Saygun I, Karacay S, Serdar M, Ural AU, Sencimen M, Kurtis B.: Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci* 2008; 23:211-5.
196. Sayed IS, Saafan A, Abdel-Gawad FK, Harhash TA, Abdel-Rahman MA: Effect of low-level laser therapy on gene expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-1 β in scalpel-induced and laser-induced oral wounds in rats. *J Dent Lasers* 2015;9:23-30
197. Conlan M.J., Rapley J.W., Cobb C.M.: Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review, *J. Clin. Periodontol.* 1996; 23:492–496.
198. Medrado AP, Soares AP, Santos ET, Reis SR, Andrade ZA.: Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. *J Photochem Photobiol B.* 2008 Sep 18; 92(3): 144-52.
199. Rezende SB, Ribeiro MS, Núñez SC, Garcia VG, Maldonado EP.: Effects of a single near-infrared laser treatment on cutaneous wound healing: biometrical and histological study in rats. *J Photochem Photobiol B.* 2007 Jun 26; 87(3):145-53.
200. Fekrazad R., Mirmoezzi A., Kalhori KA., Arany P.: The effect of red, green and blue lasers on healing of oral wounds in diabetic rats. *J Photochem Photobiol B.* 2015 Jul; 148:242-5. doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.04.018
201. Mak K, Manji A, Gallant-Behm C, Wiebe C, Hart DA, Larjava H, Häkkinen L: Scarless healing of oral mucosa is characterized by faster resolution of inflammation and control of myofibroblast action compared to skin wounds in the red Duroc pig model. *J Dermatol Sci.* 2009 Dec; 56(3):168-80. doi: 10.1016/j.jdermsci.2009.09.005.
202. Blakytyn R, Jude E.: The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med.* 2006 Jun; 23(6):594-608.
203. Brizeno LA, Assreuy AM, Alves AP, Sousa FB, de B Silva PG, de Sousa SC, Lascane NA, Evangelista JS, Mota MR: Delayed healing of oral mucosa in a diabetic rat model: Implication of TNF- α , IL-1 β and FGF-2. *Life Sci.* 2016 Jun 15; 155:36-47. doi: 10.1016/j.lfs.2016.04.033.

204. Yamano S, Kuo WP, Sukotjo C.: Downregulated gene expression of TGF- β s in diabetic oral wound healing. *J Craniomaxillofac Surg.* 2013 Mar; 41(2):e42-8. doi: 10.1016/j.jcms.2012.08.001.
205. Peplow PV, Baxter GD.: Gene expression and release of growth factors during delayed wound healing: a review of studies in diabetic animals and possible combined laser phototherapy and growth factor treatment to enhance healing. *Photomed Laser Surg.* 2012 Nov; 30(11):617-36. doi: 10.1089/pho.2012.3312.
206. Al-Watban FA, Zhang XY, Andres BL. Low-level laser therapy enhances wound healing in diabetic rats: a comparison of different lasers. *Photomed Laser Surg.* 2007 Apr; 25(2):72-7. doi:10.1089/pho.2006.1094.
207. Fahimipour F, Nouruzian M, Anvari M, Tafti MA, Yazdi M, Khosravi M, Dehghannayeri Z, Sabounchi SS, Bayat M.: Effect of low-level laser therapy on experimental wounds of hard palate mucosa in mice. *Indian J Exp Biol.* 2011 May; 49(5):357-61.
208. Brancato SK, Albina JE.: Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *Am J Pathol.* 2011 Jan; 178(1):19-25. doi: 10.1016/j.ajpath.2010.08.003.
209. Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Muller W, Roers A, Eming SA: Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol* 2010, 184:3964–3977
210. de Loura Santana C, de Fátima Teixeira Silva D, de Souza AP, Jacinto MV, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KP, França CM.: Effect of laser therapy on immune cells infiltrate after excisional wounds in diabetic rats. *Lasers Surg Med.* 2016 Jan; 48(1):45-51. doi: 10.1002/lsm.22445.
211. Hannu Larjava: Oral Wound Healing: An Overview, in *Oral Wound Healing: Cell Biology and Clinical Management*, First Edition edited by Hannu Larjava, 2012 John Wiley & Sons, Inc. pp 1-9.
212. Pereira MC, de Pinho CB, Medrado AR, Andrade Zde A, Reis SR.: Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries. *J*

- Photochem Photobiol B. 2010 Mar 8; 98(3):188-92. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2009.12.005.
213. Ribeiro MA, Albuquerque RL Jr, Ramalho LM, Pinheiro AL, Bonjardim LR, Da Cunha SS: Immunohistochemical assessment of myofibroblasts and lymphoid cells during wound healing in rats subjected to laser photobiomodulation at 660nm. *Photomed Laser Surg.* 2009 Feb; 27(1):49-55. doi: 10.1089/pho.2007.2215
214. de Loura Santana C, de Fátima Teixeira Silva D, Deana AM, Prates RA, Souza AP, Gomes MT, et al.: Tissue Responses to Postoperative Laser Therapy in Diabetic Rats Submitted to Excisional Wounds. *PLoS ONE* 2015; 10(4): e0122042. doi:10.1371/journal.pone.0122042
215. Gonzaga Ribeiro MA, Cavalcanti de Albuquerque RL, Santos Barreto AL, Moreno de Oliveira VG, Santos TB, Freitas Dantas CD.: Morphological analysis of second-intention wound healing in rats submitted to 16 J/cm² lambda 660-nm laser irradiation. *Indian J Dent Res.* 2009 Jul-Sep; 20(3):390. doi: 10.4103/0970-9290.57360.
216. Maiya AG, Kumar P, Nayak S.: Photo-stimulatory effect of low energy helium-neon laser irradiation on excisional diabetic wound healing dynamics in Wistar rats. *Indian J Dermatol.* 2009; 54(4):323-9. doi: 10.4103/0019-5154.57606.
217. Desta T, Li J, Chino T, Graves DT.: Altered Fibroblast Proliferation and Apoptosis in Diabetic Gingival Wounds. *Journal of Dental Research.* 2010; 89(6):609-614. doi:10.1177/0022034510362960.
218. Lerman O, Galiano R, Armour M, Levine J, Gurtner G.: Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *Am J Pathol* 2003; 162:303–312. [PubMed: 12507913]
219. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA.: Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2000 Dec; 5(1):40-6.
220. Kleinman K. H., Malinda M.K.: Role of Angiogenesis in Wound Healing; in *Angiogenesis Inhibitors and Stimulators: Potential Therapeutic Implications*, edited by Shaker A. Mousa. Taylor & Francis, 2000. pp:102-110

221. Colombo F, Neto Ade A, Sousa AP, Marchionni AM, Pinheiro AL, Reis SR.: Effect of low-level laser therapy ($\lambda 660$ nm) on angiogenesis in wound healing: a immunohistochemical study in a rodent model. *Braz Dent J.* 2013; 24(4):308-12. doi: 10.1590/0103-6440201301867.
222. Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, Verhaar MC, Braam B, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ.: Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes.* 2004 Jan; 53(1):195-9.
223. Schindl A, Merwald H, Schindl L, Kaun C, Wojta J.: Direct stimulatory effect of low-intensity 670nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *Br J Dermatol.* 2003 Feb; 148(2):334-6.
224. Santos NR, dos Santos JN, dos Reis JA Jr, Oliveira PC, de Sousa AP, de Carvalho CM, Soares LG, Marques AM, Pinheiro AL.: Influence of the use of laser phototherapy ($\lambda 660$ or 790 nm) on the survival of cutaneous flaps on diabetic rats. *Photomed Laser Surg.* 2010 Aug; 28(4):483-8. doi: 10.1089/pho.2009.2500.
225. Ozturan S, Inan O, Usumez A.: Blood circulation changes in palatal gingiva before and after low-level laser irradiation in rats. *J Dent Lasers* 2013; 7:17-21
226. Cury V, Moretti AIS, Assis L, et al.: Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 α and MMP-2. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology.* 2013; 125:164-170. doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.06.004.
227. Ferrara N.: Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004 Aug; 25(4):581-611.
228. Pammer J, Weninger W, Mildner M, Burian M, Wojta J., Tschachler E.: Vascular endothelial growth factor is constitutively expressed in normal human salivary glands and is secreted in the saliva of healthy individuals. *J Pathol.* 1998 Oct;186(2):186-91
229. Yan X, Chen B, Lin Y, Li Y, Xiao Z, Hou X, Tan Q, Dai J.: Acceleration of diabetic wound healing by collagen-binding vascular endothelial growth factor in diabetic rat model. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010 Oct; 90(1):66-72. doi: 10.1016/j.diabres.2010.07.001.

230. Corral CJ, Siddiqui A, Wu L, Farrell CL, Lyons D, Mustoe TA.: Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing. *Arch Surg.* 1999 Feb; 134(2):200-5.
231. Kirchner L. M., Meerbaum S. O., Gruber B. S., Knoll A. K., Bulgrin J., Taylor R.A.J., Schmidt S. P.: Effects of vascular endothelial growth factor on wound closure rates in the genetically diabetic mouse model. *Wound Repair Regen*, 2003 Mar-Apr;11(2):127-31 doi:10.1046/j.1524-475X.2003.11208.x
232. Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N, Bunting S, Steinmetz HG, Gurtner GC.: Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J Pathol.* 2004 Jun; 164(6):1935-47.
233. Altavilla D, Saitta A, Cucinotta D et al: Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis. *Diabetes.*2001 Mar; 50(3):667–674.
234. Nogami M, Hoshi T, Kinoshita M, Arai T, Takama M, Takahashi I.: Vascular endothelial growth factor expression in rat skin incision wound. *Med Mol Morphol.* 2007 Jun; 40(2):82-7.
235. Jazwa A, Kucharzewska P, Leja J, et al.: Combined vascular endothelial growth factor-A and fibroblast growth factor 4 gene transfer improves wound healing in diabetic mice *Genet Vaccines Ther.* 2010 Aug 30; 8:6. doi: 10.1186/1479-0556-8-6.
236. Frank S, et al.: Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*,1995; 270:12607–12613.
237. Thangarajah H, Yao D, Chang EI, Shi Y, Jazayeri L, Vial IN, Galiano RD, Du XL, Grogan R, Galvez MG, Januszyk M, Brownlee M, Gurtner GC.: The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in diabetic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 11;106(32):13505-10. doi: 10.1073/pnas.0906670106.
238. Kipshidze N, Nikolaychik V, Keelan MH, Shankar LR, Khanna A, Kornowski R, Leon M, Moses J.: Low-power helium: neon laser irradiation enhances production of vascular

- endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. *Lasers Surg Med.* 2001; 28(4):355-64.
239. Hakki SS, Bozkurt SB.: Effects of different setting of diode laser on the mRNA expression of growth factors and type I collagen of human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2012 Mar; 27(2):325-31. doi: 10.1007/s10103-010-0879-5.
240. Kim YJ, Carvalho FC, Souza JA, Gonçalves PC, Nogueira AV, Spolidório LC, Roque-Barreira MC, Cirelli JA.: Topical application of the lectin Artin M accelerates wound healing in rat oral mucosa by enhancing TGF- β and VEGF production. *Wound Repair Regen.* 2013 May-Jun; 21(3):456-63. doi: 10.1111/wrr.12041.
241. Đukić M, Ninković M, Jovanović M.: Oxidative stress: Clinical diagnostic significance. *Journal of Medical Biochemistry* 2008; 27(4):409-425
242. Kurahashi T, Fujii J: Roles of Antioxidative Enzymes in Wound Healing. *J. Dev. Biol.* 2015, 3, 57-70; doi:10.3390/jdb3020057
243. Dunnill C, Patton T, Brennan J, Barrett J, Dryden M, Cooke J, Leaper D, Georgopoulos NT.: Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int Wound J* 2015; doi: 10.1111/iwj.12557
244. Halliwell B, Gutteridge MC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984; 219: 157-171.)
245. Nozaik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA. Extracellular superoxide dismutase. *Intern J of Biochem & Cell Biol* 2005; 37: 2466-2471.].
246. Marklund SL. Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines. *Biochemical Journal* 1990; 266: 213–219.]
247. Mahaney MC, Czerwinski SA, Adachi T, Wilcken DEL, Wang XL. Plasma levels of extracellular superoxide dismutase in an Australian population: genetic contribution to normal variation and correlations with plasma nitric oxide and apolipoprotein A-I levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 683-688.
248. Karlsson K, Sandstrom J, Edlund A, Edlund T, Marklund SL. Pharmacokinetics of extracellular-superoxide dismutase in the vascular system. *Free Rad Biol Med* 1993; 14: 185-190.]

249. Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC, DeGraff W, Gamson J, Mitchell JB. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *PNAS* 1993; 90: 9813–9817.
250. Cruickshanks KJ, Klein BEK, Klein R. Ultraviolet light exposure and lens opacities: the Beaver Dam Eye Study. *Am J Pub Health* 1992; 82: 1658-47.
251. Bjornstedt M, Xue J-Y, Huang W-H, Akesson B, Holmgren A. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electrons donors to human plasma glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1994; 269:29382-4.
252. Anderson ME, Meister A. Dynamic state of glutathione in blood plasma. *J Biol Chem* 1980; 255: 9530-3.
253. Xu KY, Kuppusamy P. Dual effects of copper-zinc superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 1190–1193.

<i>I. Аутор</i>
Име и презиме: Надица С. Ђорђевић
Датум и место рођења: 14.03.1978. године, Приштина
Садашње запослење: Медицински факултет Универзитета у Приштини
<i>II. Докторска дисертација</i>
Наслов: „Оцена ефекта ласера мале снаге на зарастање рана здраве и дијабетесом измењене оралне слузокоже“
Број страница: 183
Број слика: 131
Број библиографских података:
Установа и место где је рад израђен: Медицински факултет Приштина, Медицински факултет Ниш
Научна област (УДК): Стоматолошке науке
Ментор: Проф. др Небојша Крунић
<i>III. Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме:
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:
1. Проф. др Зорица Ајдуковић 2. Проф. др Анкица Митић 3. Доц. др Милица Мијовић
Комисија за одбрану докторске дисертације:
Датум одбране дисертације:

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Надица С. Ђорђевић

број индекса 09/07

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Оцена ефекта ласера мале снаге на зарастање рана здраве и дијабетесом измењене оралне слузокоже“

- 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

Надица Ђорђевић

У Косовској Митровици, 07.11.2016. год.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Надица С. Ђорђевић

Број индекса 09/07

Студијски програм Докторске студије медицинских наука

Наслов рада „Оцена ефекта ласера мале снаге на зарастање рана здраве и дијабетесом измењене оралне слузокоже“

Ментор Проф. др Небојша Крунић

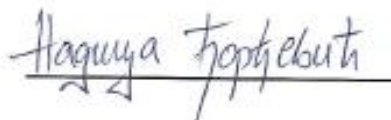
Потписани/а Надица С. Ђорђевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици.**

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 Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици.

Потпис докторанда



У Косовској Митровици, 07.11.2016. год.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Оцена ефекта ласера мале снаге на зарастање рана здраве и дијабетесом измењене оралне слузокоже“

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 Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици 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

Нагшја Ђорђевић

У Косовској Митровици, 07.11.2016. год.

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

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

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

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

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

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