

UNIVERZITET U BEOGRADU

STOMATOLOŠKI FAKULTET

Katarina V. Radović

**VASKULARNI ENDOTELNI FAKTOR RASTA U  
GINGIVI I PLJUVAČKI U DIJABETES  
MELITUSU: ZNAČAJ ZA MEHANIČKI STRES I  
ORALNU HOMEOSTAZU KOD PACIJENATA  
SA IMEDIJATNIM MOBILNIM ZUBNIM  
NADOKNADAMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Katarina V. Radović

**GINGIVAL AND SALIVARY VASCULAR  
ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN  
DIABETES MELLITUS: SIGNIFICANCE IN  
MECHANICAL STRESS AND ORAL  
HOMEOSTASIS IN IMMEDIATE DENTURE  
WEARERS**

Doctorial Dissertation

Belgrade, 2013

## **MENTOR**

Prof. Dragica Stojić,

redovni profesor Stomatološkog Fakulteta Univerziteta u Beogradu

## **KOMISIJA ZA OCENU I ODBRANU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE**

Prof. dr Dragoslav Stamenković,  
redovni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

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

Doc. dr Božidar Brković,  
docent Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Jugoslav Vasić,  
redovni profesor Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Vojkan Lazić,  
vanredni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

## **DATUM ODBRANE**

*S ljubavlju, ovu doktorsku disertaciju posvećujem mami i tati*

Izradu ove disertacije pratila je velika pomoć mojih učitelja, kolega i porodice. Ovom prilikom, želela bih da se zahvalim:

- Prof. dr Dragici Stojić, mom dragom mentoru, za neizmeran trud, strpljenje i predanost kojom me je vodila kroz bazična i klinička istraživanja, kao i prenetu saznanja tokom izrade ove teze.
- Doc. dr Božidaru Brkoviću na divnoj saradnji i bezrezervnoj pomoći u hirurškom delu kliničkog istraživanja, kao i prijateljskim sugestijama i savetima.
- Doc. dr Jeleni Roganović na ogromnoj pomoći u izvodjenu eksperimentalnih postupaka i drugarskoj podršci tokom izrade teze.
- Članovima komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije: Prof. Dr Dragoslavu Stamenkoviću, dragom učitelju, koji mi je pružio prva saznanja o naučno-istraživačkom radu i podršku tokom svih ovih godina, Prof dr Georgini Pudar i Prof dr Jugoslavu Vasiću na velikoj pomoći i savetima u okviru kliničke studije i studije na životinjama, kao i Prof. dr Vojkanu Laziću na korisnim sugestijama.
- Spomenki Lučić na neizmernoj pomoći u radu sa eksperimentalnim životinjama.
- Dr Jugoslavu Iliću i dr Ljiljani Djukić na pomoći tokom eksperimentalnih faza.
- Prof dr Dubravku Bokonjiću na savetima vezanim za statističku analizu.
- Zaposlenima Klinike za stomatološku protetiku za svu pruženu pomoć
- Mojoj porodici na pruženoj ljubavi, razumevanju i podršci.

# **VASKULARNI ENDOTELNI FAKTOR RASTA U GINGIVI I PLJUVAČKI U DIJABETES MELITUSU: ZNAČAJ ZA MEHANIČKI STRES I ORALNU HOMEOSTAZU KOD PACIJENATA SA IMEDIJATNIM MOBILNIM ZUBNIM NADOKNADAMA**

## **SAŽETAK**

Faktor rasta vaskularnog endotela (Vascular endothelial growth factor, VEGF) ima značajnu ulogu u procesima angiogeneze, vaskulogeneze i neurogeneze. U fiziološkim uslovima, angiogeneza je značajna za zarastanje rana i obnovu krvotoka kroz tkiva posle povrede, dok u patološkim uslovima, kada se poremeti fiziološka regulacija angiogenih faktora rasta, uključujući VEGF i njihovih inhibitora dolazi do prekomernog ili nedovoljnog stvaranja krvnih sudova. Na ekspresiju VEGF značajan efekat imaju lokalni faktori na mestu stvaranja ovog faktora rasta u koje se ubrajaju: hipoksija, mehanički stres, azot monoksid, pH, glikemija i hormoni.

Stalno prisustvo VEGF je utvrđeno u tkivima i tečnostima usne šupljine (gingiva, tečnost gingivalnog sulkusa, pljuvačka), kao i da se ono menja u toku patoloških procesa. Diabetes mellitus tip 2 (DM tip 2) je oboljenje u kome su najčešće sistemske komplikacije nefropatija, retinopatija i otežano zarastanje rana, direktno posledice mikro i makrovaskulopatija i neuropatija. Dobro dokumentovane kliničke studije pokazuju da je DM tip 2 povezan sa povećanom incidencom oralnih poremećaja kao što su: parodontopatija, hipofunkcija pljuvačnih žlezda, različiti oblici stomatitisa, kao i usporeno zarastanje rana. Više faktora koji leže u osnovi DM tip 2 utiče na incidencu ovih oralnih poremećaja: povećan oksidativni stres, smanjene odbrambene snage, hronična inflamacija,

vaskulopatije i poremećena sekrecija pljuvačke. VEGF kao jedan od najznačajnijih signalnih molekula vezanih za komplikacije DM tip 2 može biti povišen ili snižen u toku ove bolesti.

Imajući u vidu činjenicu da je jedan od značajnih faktora u terapiji DM tip 2 i dobro balansirana i redovna ishrana koja uz antidijabetične lekove omogućuje normoglikemiju, zubne nadoknade imaju veliki značaj za rehabilitaciju izgubljene mastikatorne funkcije kod bezubih i krezubih DM tip 2 pacijenata. Posle ekstrakcije zuba, za razliku od protetskih pacijenata koji nisu oboleli od DM tip 2, imedijatna mobilna zubna proteza predstavlja terapiju izbora kod DM pacijenata, jer i u postekstrakcionom periodu omogućava adekvatnu mastikaciju čvrste hrane koja je neophodna za održavanje glikemije. Imajući u vidu da DM tip 2 menja fiziološki odgovor potpornih tkiva na prisustvo proteze, a da nema podataka o ćelijskim mehanizmima kojim DM tip 2 izaziva promene oralnih tkiva u prisustvu proteze, postavili smo hipotezu da DM tip 2 menja nivo VEGF u pljuvački i gingivi ispod imedijatnih totalnih zubnih proteza (ITZP) u odnosu na zdrave ljude, da su ove promene u korelaciji sa pritiskom zubne proteze i da se značajno odražavaju na pojavu stomatitisa ispod ITZP, kao i na zarastanje rana posle ekstrakcije zuba u pretprotetskoj pripremi pacijenata.

Ciljevi istraživanja bili su: 1. Odrediti koncentraciju VEGF u gingivi sa mesta ekstrakcije zuba (preprotetska priprema) i /ili gingivi na mestu pritiska stare mobilne zubne proteze, kod pacijenata sa DM tip 2 i u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika; 2. Odrediti i ispitati na animalnom modelu pacova vezu između koncentracije VEGF u gingivi ispod kompresivne i akompresivne protezne ploče u grupi životinja sa eksperimentalno izazvanim DM i u kontrolnoj grupi životinja; 3. Ispitati vezu između koncentracije VEGF u pljuvački i toka zarastanja ekstrakcionih rana (nastalih zbog

preprotetske hirurške pripreme) kod pacijenata sa DM tip 2 i u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika; 4. Ispitati vezu između koncentracije VEGF u gingivi i toka zarastanja hirurške rane ispod protezne ploče na animalnom modelu pacova sa eksperimentalno izazvanim DM i u kontrolnoj grupi životinja; 5. Ispitati odnos između koncentracije VEGF u pljuvački i pojave stomatitisa ispod ITZP u toku godinu dana kod pacijenata sa DM tip 2 i u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika.

Koncentracije VEGF u pljuvački i gingivi kod ljudi, kao i koncentracija VEGF u palatinalnoj sluznici na animalnom modelu pacova određivana je ELISA imunoesejom. Praćeni klinički parametri zarastanja rana bili su: veličina gingivalne hiperemije (rangirana sa tri stepena: slaba, srednja i jaka), učestalost prisustva ulceracija i nekroza gingive (označeno sa: prisutno i nije prisutno) i pojava postekstrakcionog bola (merene VAS i VRS skalom). Prisustvo proteznog stomatitisa je rangirano prema Njutnovoju klasifikaciji (Njutn tip I, Njutn tip II i Njutn tip III).

Studijom na ljudima je obuhvaćeno 42 zdrava ispitanika i 36 pacijenata sa DM tip 2, nosilaca parcijalnih pločastih proteza (PPP), kojima je bila indikovana izrada ITZP. Svim ispitanicima su kvantifikovane koncentracije tkivnog VEGF iz akompresivnih uzoraka gingive (nepokrivenih PPP) i kompresivnih uzoraka gingive (ispod PPP) uzetih tokom ekstrakcije zuba. Koncentracije VEGF u pljuvački su izmerene kod svih ispitanika pre ekstrakcije zuba i 3. dana posle ekstrakcija zuba, uz praćenje kvaliteta zarastanja postekstrakcionih rana ispod ITZP u periodu od 3 nedelje. Posle godinu dana nošenja podloženih ITZP, obavljen je kontrolni pregled pacijenata radi dijagnostikovanja proteznog stomatitisa i faktora rizika za nastanak ove pojave. Tom prilikom su izmerene koncentracije VEGF u pljuvački kod pacijenata sa znacima proteznog stomatitisa.



Studija na životinjama je sprovedena na 40 zdravih pacova i 40 pacova sa eksperimentalno izazvanim DM jednom intraperitonealnom dozom (150mg/kg) aloksana. Svim pacovima su izradjene akrilatne eksperimentalne palatinalne ploče ekstenđirane duž palatuma od prvog do trećeg molara sa obe strane vilice. U zavisnosti od toga da li su ploče bile izradjene preko intaktne sluznice ili eksperimentalne hirurške rane, kao i vrste kompresije koju je izazivala eksperimentalna ploča, pacovi su bili podeljeni u 8 grupa. Posle 3 dana nošenja eksperimentalnih palatinalnih ploča, životinje su žrtvovane i uzeti su uzorci palatinalne sluznice ispod eksperimentalnih ploča u kojima su izmerene koncentracije VEGF.

Koncentracije tkivnog VEGF kod pacijenata sa DM tip 2 su bile statistički značajno manje samo u isečcima kompresivne gingive u odnosu na zdrave ispitanike ( $27,18 \pm 1,0$  pg/ml vs  $12,58 \pm 1,21$  pg/ml). Koncentracije VEGF u kompresivnom delu gingive su bile značajno manje, kako u grupi zdravih ispitanika, tako i kod pacijenata sa DM tip 2, u odnosu na koncentracije VEGF iz akompresivne njihove gingive, pri čemu je ovo sniženje bilo značajno veće kod pacijenta sa DM tip 2 (28% vs 66%).

Koncentracija VEGF u pljuvački kod pacijenata sa DM tip 2 je bila statistički značajno veća u odnosu na zdrave ispitanike kako pre, tako i 3 dana posle ekstrakcija zuba ( $557,6 \pm 94,7$  pg/ml vs  $103,5 \pm 21,6$  pg/ml i  $615,5 \pm 63,7$  pg/ml vs  $1963,0 \pm 134,3$  pg/ml). Pacijenti sa DM tip 2 su pokazali statistički značajno duže vreme epitelizacije postekstrakcionih rana u odnosu na grupu zdravih ispitanika, značajno veću hiperemiju gingive (3. i 7. dana posle ekstrakcija zuba) i povećanu učestalost gingivalne nekroze i ulceracija (3. i 14. dana posle ekstrakcija zuba). Učestalost pojave proteznog stomatitisa, posle godinu dana nošenja ITZP je bila 61% kod pacijenata sa DM tip 2 i 38% kod zdravih ispitanika. Loša stabilnost proteza i DM tip 2 su bili faktori rizika značajno povezani sa

ovom pojavom. Koncentracije VEGF u pljuvački u grupi ispitanika sa Newton tip I i Newton tip II proteznim stomatitisom su se značajno razlikovale između pacijenata sa DM tip 2 i zdravih ispitanika, nosilaca ITZP ( $460.9 \pm 55.4$  pg/ml i  $1445.2 \pm 422.1$  pg/ml kod DM tip 2, and  $73.2 \pm 10.0$  pg/ml i  $306.5 \pm 22.6$  kod zdravih ispitanika).

Koncentracije VEGF iz intaktne sluznice ispod eksperimentalne palatinalne ploče, su bile značajno niže kod pacova sa DM u odnosu na zdrave, kako u prisustvu akompresivne palatinalne ploče (za 28%), tako i pod kompresivnom palatinalnom pločom (za 33%), za razliku od koncentracije VEGF koja se nije razlikovala između ispitivanih grupa pre postavljanja palatinalne ploče. Porast koncentracija VEGF u prisustvu kompresivne eksperimentalne ploče postavljene preko hirurške rane je bio značajno manji kod pacova sa DM u odnosu na kontrolnu grupu, za razliku od akompresivne eksperimentalne ploče postavljene preko hirurške rane, koja nije dovela do značajne razlike u koncentraciji VEGF između ispitivanih grupa.

Imajući u vidu malobrojne podatke o promenama koje DM tip 2 kao hronična bolest izaziva na oralnim tkivima ispod zubnih proteza i sa druge strane činjenicu da VEGF ima značajnu ulogu u hipoksiji makro- i mikrovaskularnih komplikacija dijabetesa, poznavanje bližih mehanizama promena u oralnim tkivima kod pacijenata, nosilaca zubnih proteza obolelih od DM tip 2 je od posebnog kliničkog značaja. Određivanje VEGF u gingivi i pljuvački je omogućilo bliži uvid u proces zarastanja ekstrakcionih rana, uticaju pritiska i pojavi stomatitisa ispod ITZP. Ovo posebno stoga, što su u svetu već započeta istraživanja novih terapijskih pristupa za modulaciju VEGF u toku dijabetičnih mikrocirkularnih promena.

KLJUČNE REČI: VEGF, ITZP, DM tip 2, eksperimentalno izazvan DM, zarastanje rana, protezni stomatitis i pritisak proteze.

NAUČNA OBLAST: Stomatološke nauke

UŽA NAUČNA OBLAST: Kliničke stomatološke nauke

UDK broj

# **GINGIVAL AND SALIVARY ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN DIABETES MELLITUS: SIGNIFICANCE IN MECHANICAL STRESS AND ORAL HOMEOSTASIS IN IMMEDIATE DENTURE WEARERS**

## **SUMMARY**

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is critical component in processes of angiogenesis, vasculogenesis and neurogenesis. Angiogenesis is important for wound healing and for restoring blood flow to tissues after injury or insult. When regulation of angiogenic growth factors, such as VEGF, fails, blood vessels are formed excessively or insufficiently. Important environmental effects on VEGF expression include: hypoxia, mechanical stress, nitric oxide, acid conditions, glycemia and hormones.

VEGF is constitutively expressed in oral tissues such as gingiva, gingival cervical fluid, and saliva and is affected by various pathological processes. Diabetes mellitus type 2 (DM type 2) is associated with a range of basic complications such as, neuropathy, microvascular and macrovascular disease and altered wound healing. Also DM type 2 is linked with increased incidence of several oral conditions: periodontal disease, salivary gland dysfunction, burning mouth, delayed healing of wounds and mucosa ulcerations. There is a suggestion that these abnormalities, most likely are related to increased oxidative stress, compromised host defense, chronic systemic inflammation, vasculopathy and impaired salivary secretion. It is well documented that DM type 2 and associated complications significantly alter VEGF levels.

Since good and well balanced diet is a part of diabetic therapy, prosthetic rehabilitation of reduced masticatory functions is especially significant for such patients. Immediate complete denture is the best choice for DM patients, because of providing the possibility of solid food nutrition in the postextraction period. Having in mind that DM type 2 alters the physiological response of denture-bearing tissues and there is no data about cellular mechanisms in such conditions, we have sought to verify the hypothesis that gingival and salivary VEGF levels are altered in DM type 2 patients comparing to healthy subjects, both denture wearers and that VEGF levels correspond to denture pressure, appearance of denture stomatitis and affect intraoral wound healing process under complete immediate dentures.

The aims of this study were to: 1. Determine gingival VEGF concentration at the extraction sites that were compressed (covered) or not covered by removable partial dentures, in DM type 2 participants and in control group of healthy participants; 2. Determine the concentration of VEGF in tissue of rat as an animal model, that was covered by a compressive/compressive palatal plate, in group with experimentally induced DM, as well as in control group of healthy animals; 3. Determine correlation between salivary VEGF and postextraction wound healing under complete immediate denture in participants with DM type 2 and healthy participants; 4. Determine and examine the correlation between VEGF levels in tissue of rat as an animal model and wound healing under palatal plate in group with experimentally induced DM, as well as in control group of healthy animals; 5. Determine and examine the correlation between salivary VEGF and presence of denture stomatitis after one year wearing complete immediate dentures in participants with DM type 2 and in control group of healthy participants.

VEGF concentrations in human gingival tissue lysates and saliva, as well as VEGF concentrations in rat palatal mucosa were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Evaluation of postextraction wound healing quality involved: gingival hyperemia (ranged as slight, middle and severe), gingival ulcerations and gingival superficial necrosis (both recorded as *yes* or *no*), as well as, records of postextraction pain (measured by VAS and VRS scale). The presence of denture stomatitis was ranged according to the Newton classification (Newton Type I, Newton Type II and Newton Type III).

The human study was conducted on 42 healthy and 36 participants with controlled DM type 2, candidates for complete immediate dentures, both removable partial denture wearers. Gingival VEGF concentrations were measured in acccompressive tissue samples (not covered by denture) and compressive tissue samples (covered by denture) taken during teeth extraction. Salivary VEGF concentrations were measured in all participants conducted in the study, before teeth extraction and on the third day of the postextraction period. Parameters of wound healing under complete immediate dentures were checked during the postextraction period of three weeks. In order to determine the presence and risk factors for denture stomatitis, all participants were checked after one year wearing relined complete immediate dentures. Salivary VEGF levels were measured only in patients who exhibited denture stomatitis.

The animal study was conducted on 40 healthy rats and 40 rats with experimentally induced DM using single dose of alloxan (150mg/kg, intraperitoneal). Acrylic experimental plates were inserted palatally to all animals. All animals were divided into eight experimental groups depending on the type of palatal palate (compression/acompression) and the presence/absence of experimental surgical

wounds. Three days after palatal plate insertion, animals sacrificed, and tissue specimens under palatal plates were obtained.

Gingival VEGF concentrations in compressive tissue specimens were significantly lower in DM type patients comparing to controls ( $27.18 \pm 1.0$  pg/ml vs  $12.58 \pm 1.21$  pg/ml). Gingival VEGF levels in compressive tissue specimens were significantly lower comparing to VEGF levels measured in acompressive tissue specimens, in both groups of participants, with the higher decrease of VEGF levels in DM type 2 patients (28% vs 66%).

Salivary VEGF concentration in DM type 2 patients was significantly higher comparing to healthy participants at the beginning of the study and 3. days after teeth extraction ( $557.6 \pm 94.7$  pg/ml vs  $103.5 \pm 21.6$  pg/ml and  $615,5 \pm 63,7$  pg/ml vs  $1963,0 \pm 134,3$  pg/ml). Diabetic group of patients exhibited significantly higher values of gingival hyperemia (3. and 7. day of postextraction period), higher incidence of gingival necrosis and ulcerations (3. and 14. days of postextraction period) and time-related delay of wound healing. The incidence of denture stomatitis was 61% in DM type 2 and 38% in control subjects. Low denture stability and DM type 2, were risk factors for denture stomatitis. In Newton type I and Newton type II denture stomatitis VEGF levels were  $460.9 \pm 55.4$  pg/ml and  $1445.2 \pm 422.1$  pg/ml in diabetic, and  $73.2 \pm 10.0$  pg/ml and  $306.5 \pm 22.6$  pg/ml in controls, respectively.

Tissue VEGF concentrations were significantly lower in DM rats comparing the controls regardless the type of compression of palatal plate. Tissue VEGF values didn't show any statistical difference between observed groups before palatal plate insertion. The increase of VEGF levels caused by compressive palatal plate insertion over the experimental incisal surgical wound was significantly

lower in DM rats comparing to controls. Contrary, the presence of acompressive plate over the experimental incisal surgical wound didn't cause any difference between observed groups.

Having in mind the lack of data about denture-bearing tissue alterations in DM type 2 patients and the role of VEGF in microvascular and macrovascular diseases associated with DM type 2, better understanding of the tissue alterations mechanism in DM type 2 denture wearers is necessary for clinical implication. Determination of salivary and gingival VEGF levels highlight the process of postextraction wound healing, influence of pressure on denture-bearing mucosa and appearance of denture stomatitis in immediate denture wearers. In connection with this, there are studies that implicate that the modulation of VEGF activity could be potentially useful therapeutic approach for regulation of DM type 2 oral complications.

KEY WORDS: VEGF, immediate denture, DM type 2, experimentally induced DM, wound healing, denture stomatitis, denture pressure.

SCIENTIFIC FIELD: Dental Sciences

SPECIFIC SCIENTIFIC FIELD: Clinical Dental Sciences

UDC:



# **SADRŽAJ**

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1 VEGF</b>	<b>2</b>
<b>1.2 VEGF I ORALNA TKIVA</b>	<b>5</b>
<b>1.3 VEGF I DM</b>	<b>8</b>
<b>1.4 VEGF, DM I ORALNA TKIVA</b>	<b>11</b>
<b>1.5 DM I NOSIOCI ZUBNIH PROTEZA</b>	<b>14</b>
<b>2. RADNA HIPOTEZA</b>	<b>17</b>
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	<b>19</b>
<b>4. MATERIJAL METODE</b>	<b>21</b>
<b>4.1 KLINIČKO ISTRAŽIVANJE</b>	<b>22</b>
<b>4.1.1 Ispitanici</b>	<b>22</b>
<b>4.1.2 Faze kliničkog istraživanja</b>	<b>23</b>
<b>4.1.3 Detekcija salivarnog i tkivnog VEGF</b>	<b>27</b>
<b>4.2 ISTRAŽIVANJE NA LABORATORIJSKIM ŽIVOTINJAMA</b>	<b>31</b>
<b>4.2.1 Laboratorijske životinje</b>	<b>31</b>
<b>4.2.2 Faze istraživanja na animalnom modelu pacova</b>	<b>32</b>

<b>4.2.3 Detekcija tkivnog VEGF kod pacova</b>	<b>33</b>
<b>4.3 STATISTIČKA ANALIZA</b>	<b>34</b>
<b>5. REZULTATI</b>	<b>35</b>
<b>5.1 KLINIČKO ISTRAŽIVANJE</b>	<b>36</b>
<b>5.1.1 Karakteristike ispitanika</b>	<b>36</b>
<b>5.1.2 Kvalitet zarastanja postekstrakcionih rana u toku nošenja ITZP</b>	<b>38</b>
<b>5.1.3 VEGF u pljuvački i gingivi kod nosilaca ITZP</b>	<b>44</b>
<b>5.1.4 Protezni stomatitis tokom nošenja ITZP</b>	<b>46</b>
<b>5.1.4.1 Faktori rizika za pojavu proteznog stomatitisa</b>	<b>46</b>
<b>5.1.4.2 Protezni stomatitis i VEGF u pljuvački</b>	<b>51</b>
<b>5.2. ISPITIVANJE NA LABORATORIJSKIM ŽIVOTINJAMA</b>	<b>53</b>
<b>5.2.1 Karakteristike zdravih pacova i pacova sa eksperimentalno izazvanim DM</b>	<b>53</b>
<b>5.2.2 VEGF u palatinalnoj sluznici pacova</b>	<b>54</b>
<b>6. DISKUSIJA</b>	<b>60</b>
<b>7. ZAKLJUČCI</b>	<b>69</b>
<b>8. LITERATURA</b>	<b>72</b>

# **1. UVOD**

## 1.1 VEGF

Vaskularni endotelni faktori rasta predstavljaju familiju faktora rasta koja kod sisara ima 5 članova: VEGF (ili VEGF-A), faktor rasta placentne (PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D (1). Molekul VEGF čine dva ista polipeptida kovalentno povezana sa dve disulfidne veze (2). Humani gen za VEGF ima osam eksona koji su odvojeni sa sedam introna, i lokalizovan je na hromozomu 6p21.3.(3). Povezivanjem eksona se u procesu sinteze proteina dobijaju četiri izomerna oblika VEGF koji mogu imati 121, 165, 189 i 206 aminokiselina (obeležni kao VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> i VEGF<sub>206</sub>). Za razliku od VEGF<sub>121</sub> koji je kiseli rastvorljivi polipeptid (što mu daje sposobnost da odmah ispolji efekte), izomerne forme VEGF<sub>189</sub> i VEGF<sub>206</sub> odlikuju bazna osobina kao i mogućnost deponovanja u međucelijski matriks odakle mogu da se oslobode u rastvorljive, aktivne oblike vezivanjem za heparin. Najzastupljeniji oblik faktora rasta vaskularnog endotela je VEGF<sub>165</sub>, koji može da se nađe bilo kao rastvorljiv ili kao vezan za ćelijsku membranu ili međucelijski matriks (3).

Biološke funkcije VEGF familije se ostvaruju aktivacijom 3 strukturno homologa receptora koji su genetski eksprimirani na endotelnim ćelijama krvnih sudova: VEGF-R1, VEGF-R2 i VEGF-R3 koji se eksprimira primarno na limfatičnim endotelnim ćelijama. Po receptornom transdukcionom signalu ovi receptori pripadaju grupi transmembranskih tirozin-kinaza receptora (4). VEGF-A je agonist sa afinitetom za VEGF-R1 i VEGF-R2. PlGF i VEGF-B su agonisti za VEGF-R1, a VEGF-C i VEGF-D imaju afinitet za VEGF-R2 i VEGF-R3 (1,5).

Osnovna uloga VEGF je opstanak i mitozna endotelnih ćelija, što je pokazano u *in vitro* i *in vivo* studijama (6,7). Put za mitogenu aktivnost, kao i za zaštitu endotelnih ćelija od apoptoze, predstavlja dejstvo VEGF-C i VEGF-B na receptor VEGF-R3 (8). Iako VEGF pokazuje veliku specifičnost za

endotelne ćelije, njegovi mitogeni efekti se mogu zapaziti i na drugim tipovima ćelija kao što su epitelne ćelije retine, Švanove ćelije i ćelije pankreasnog duktusa što su pokazale *in vitro* studije (9,10).

Pokazano je da VEGF učestvuje i u kontroli propustljivosti krvnih sudova i vazodilataciji kako u *in vitro*, tako i u *in vivo* uslovima, što se vezuje za modulatornu ulogu ovog faktora rasta u inflamaciji i drugim patološkim stanjima (11-13). VEGF povećava propustljivost krvnih sudova za vodu i velike molekule proteina i modulira fenestraciju i *tight junction* krvnih sudova (14,15). Izolovani proteini iz plazme uz ekstravaskularni gel od fibrina omogućavaju rast endotelnih ćelija, a VEGF kao mitogeni faktor učestvuje u daljem širenju vaskularne mreže (16)

Zahvaljujući činjenici da utiče na stimulaciju rasta i deobu endotelnih ćelija, VEGF ima kritičnu ulogu u regulaciji angiogeneze koja predstavlja proces stvaranja novih krvnih sudova iz postojeće vaskularne strukture. Aktivacija angiogeneze je posredovana dejstvom VEGF-A na receptor VEGF-R2, čime nastaju proliferacija, širenje, migracija endotelnih ćelija, povećanje propustljivosti endotela i vaskularna hemostaza (17,18). Angiogeneza je neophodna za fiziološke procese kao što su rast i diferencijacija organa tokom embriogeneze, reproduktivna funkcija kod odraslih, kao i za zarastanje rana i obnova krvotoka kroz tkiva posle povrede (19,20).

Zarastanje rana je proces koji uključuje hemostazu, inflamatornu reakciju, diferencijaciju, proliferaciju i migraciju mezenhimalnih ćelija, angiogenezu, reepitelizaciju, kao i stvaranje kolagena. Prisustvo VEGF kao ključnog faktora angiogeneze, u ranim fazama zarastanja je pokazano u mnogobrojnim studijama. Naime, već tokom hemostaze koja nastaje neposredno nakon povredjivanja tkiva, dolazi do oslobadjanja proinflamatornih citokina i faktora rasta medju kojima su TGF, PDGF, FGF i EGF koji indukuju ekspresiju VEGF mRNA (21). U sledećoj, inflamatornoj fazi

zarastanja dolazi do infiltracije neutrofila, limfocita i makrofaga i sledstvenog oslobadjanja citokina koji aktiviraju leukocite, uklanjaju mrtve ćelije i stimulišu pojavu keratinocita, fibroblasta, kao i angiogenezu. U ovoj fazi zarastanja koja je praćena porastom vaskularne propustljivosti, znaćajan izvor VEGF, uz makrofage, predstavljaju i fibroblasti i keratinociti koji su odgovorni za ekspresiju VEGF mRNA trećeg dana po povredjivanju tkiva (19). Osim porasta VEGF u tkivnim uzorcima rane, pojedine klinićeke studije su prikazale i visoke koncentracije VEGF u tećnostima rane tokom inflamatorne faze zarastanja (22,23).

U patoloćkim uslovima, kada se poremeti fizioloćka regulacija angiogenih faktora rasta, ukljućujući VEGF i njihovih inhibitora, dolazi do prekomernog ili nedovoljnog stvaranja krvnih sudova. Angiogeni procesi u patoloćkim stanjima kao što su ishemija, zapaljenje i rast tumora su posredovani aktivacijom VEGF-R1 receptora sa VEGF-B i PlGF (24,25). Nedovoljna angiogeneza doprinosi ishemiji, a prekomerna mnogobrojnim hronićnim i autonomnim oboljenjima medju koje se ubrajaju psorijaza, osteoarthritis, reumatoidni arthritis, multiplaskleroza, encefalomijelitis, kontaktna hipersenzitivnost (26, 27, 28, 29). Poremećaj angiogeneze indukovano povećanjem VEGF je uoćen i u neovaskularizaciji i rastu tumora, gde hraneći obolela tkiva, novi krvni sudovi uništavaju zdrava tkiva (30).

Na ekspresiju VEGF znaćajan efekat imaju lokalni faktori na mestu stvaranja ovog faktora rasta u koje se ubrajaju hipoksija, pH, glikemija, mehanićki stres i NO. Hipoksija je najsnaćniji stimulan za stvaranje VEGF kako *in vitro* tako i u *in vivo* uslovima što su pokazale brojne studije. U hipoksiji, ekspresija VEGF mRNA je indukovana brzo i reverzibilno u mnogim ćelijama ukljućujući normalne i patoloćki izmenjene što je pokazano *in vitro* studijama (31-33). Sobiazirom na to da tokom patoloćkih procesa dolazi i do promene kiselosti kojom su izloćene endotelne ćelije, interesantna je

studija Brooks i sar. (34) koji su pratili uticaj promene kiselosti i glikemije na VEGF u ishemičnim tkivima retine. Ovi autori su pokazali da u hipoksičnim uslovima, porast glikemije i pH dovode do rasta VEGF, dok smanjenje glikemije i sniženje pH umanjuje vrednosti VEGF. *In vitro* studije su pokazale da privremeno izlaganje endotelnih ćelija u slabo kiselim uslovima povećava ekspresiju VEGF, dok dugotrajno izlaganje u uslovima slabe ili jake kiselosti prekida ekspresiju VEGF (34,35). Mehaničke sile moduliraju funkciju endotelnih ćelija različitim mehanizmima uključujući i regulaciju transkripcije gena. Shin i sar. (36,37) i Vouyouka i sar. (38) su pokazali da primena kontinuiranog i /ili pulsirajućeg pritiska u *in vitro* uslovima na izolovanim krvnim sudovima aktivira transkripciju gena za proliferaciju endotela, kao i da je glavni signalni molekul u tim procesima VEGF. Yang i sar. (39) su prateći angiogenezu u ćelijama mokraćne bešike pokazali da ciklično istezanje glatkih mišićnih ćelija stimuliše ekspresiju VEGF. Visoka koncentracija NO smanjuje ekspresiju VEGF, dok smanjena koncentracija NO povećava ekspresiju ovog faktora (40,41).

## **1.2 VEGF I ORALNA TKIVA**

Stalno prisustvo VEGF je utvrđeno u tkivima i tečnostima usne šupljine (gingiva, tečnost gingivalnog sulkusa, pljuvačka) i ono se menja u toku patoloških procesa. Najveći broj studija u kojima je ispitivano prisustvo VEGF u oralnim tkivima odnose se na ulogu ovog faktora rasta u peridontitisu, kao hroničnom zapaljenskom oboljenju. Johnson i sar. (42) su uočili vezu između porasta broja krvnih sudova, koncentracije VEGFa u pripojnoj gingivi i dubine parodontalnih džepova. Kubata i sar. (43) su pokazali da je ekspresija gena za VEGF veća kod agresivnog oblika

parodontitisa nego kod hroničnog. Morozumi i sar. (44) su uočili da je ekspresija VEGF mRNA pojačana u neutrofilima stimulisanim *Porfiromonas gingivalisom*, bakterijom značajnom za pojavu parodontitisa. Prapulla i sar. (45) su pokazali da je koncentracija VEGF u tečnosti gingivalnog sulkusa veća kod pacijenata sa parodontitisom nego kod zdravih i da perodontalna terapija smanjuje koncentraciju VEGF. Suprotno nalazima Prapulla i sar. (45), Cetinkaya i sar. (46) su kod obolelih od parodontopatije uočili povišenu ekspresiju VEGF na strani zarastanja u odnosu na inflamirane zone, pa su pojavu VEGF tokom parodontopatije vezivali više za procese zarastanja nego inflamacije. Booth i sar. (47) su takodje pokazali više koncentracije VEGF u tečnosti gingivalnog sulkusa na zdravoj strani u odnosu na obolelu kod pacijenata sa parodontopatijom. Ovi autori su uočili i vezu između parodontalnog statusa i koncentracije VEGF u pljuvački. pomenuti autori, kao i Taichman i sar. (48) smatraju je da inflamirana gingiva i tečnost gingivalnog sulkusa tokom parodontopatije doprinose porastu VEGF u pljuvački koji direktno utiče na oralno zdravlje.

Kliničke studije pokazuju da rane na oralnoj sluznici zarastaju brže nego na koži (49). Szpaderska i sar. (50) su pokazali da su vaskularna mreža, kao i koncentracija VEGF u oralnim ranama značajno manji nego u ranama u koži, stoga što je značajno veća ekspresija VEGF proteina i mNRA u epidermalnim keratinocitima nego u oralnim keratinocitima. Brže zarastanje rana u oralnoj sluznici autori pripisuju s jedne strane činjenici da je u normalnoj koži ekspresija VEGF niska i da se povećava zarastanjem rana, a sa druge strane činjenici da su rane na oralnoj sluznici u kontaktu sa VEGF iz pljuvačke. Na značaj VEGF poreklom iz keratinocita oralne sluznice ukazuje rad Nakanishi i sar. (51), koji su pokazali u *ex vivo* uslovima, da se u graftu oralne sluznice eksprimira VEGF mNRA i da takvi graftovi oslobadjaju značajne količine VEGF, što je od značaja za procese vaskularizacije posle transplantacije grafta. Od posebnog značaja su klinički nalazi Orsini i sar. (52)



o zarastanju rana ispod privremenih mostova od keramike i akrilata. Koristeći VEGF kao marker zarastanja, ovi autori su pokazali da ispod keramičkog privremenog mosta oralna sluznica bolje zarasta i da je koncentracija VEGF manja u odnosu na postekstrakcionu ranu ispod privremenog akrilatnog mosta. O značaju VEGF za mehanizme zarastanja implantata ukazuje rad Cornellini i sar. (53). Ovi autori su poredjenjem koncentracije VEGF u zdravoj gingivi i u tkivu oko implantata sa periimplantitisom uočili sniženu ekspresiju VEGF u ćelijama uzoraka sa periimplantitisom u odnosu na zdravo tkivo, kao i da ekspresija VEGF u tkivima nakon ugradnje implantata može biti značajan pokazatelj uspešnosti ove intervencije.

Mali broj radova se odnosi na korelaciju izmedju koncentracije VEGF u oralnim tkivima i pljuvački i zarastanju oralnih ulceracija. Tao i sar. (54) su pokazali da je ekspresija tkivnog VEGF u korelaciji sa kliničkim formama oralnog lichen planusa i značajno je veća u odnosu na zdrave ispitanike. Brozović i sar. (55) su uočili promenjene vrednosti VEGF u pljuvački tokom rekurentnog aftoznog stomatitisa u odnosu na zdrave ispitanike, kao i vezu izmedju koncentracije VEGF i različitih stepena inflamacije kod ovog oboljenja.

Procesi angiogeneze u oralnim tkivima značajno su povezani sa mehaničkim stresom izazvanim ortodontskim pomeranjem zuba. Yoshino i sar (56) su *in vitro* studijom pokazali da mehanički stres u humanim fibroblastima periodontalnog ligamenta stimuliše angiogenezu preko ekspresije VEGF. Miyagawa i sar. (57) i Motokawai sar. (58) su pokazali da i u osteoblastima kontinuirano i ciklično dejstvo sile povećavaju nivo VEGF.

Prisustvo i značaj VEGF su uočeni i u tkivu dentina i pulpe. Matuela i sar. (59) su pokazali da se na endotelnim ćelijama pulpe kako mlečnih, tako i mladih stalnih zuba nalaze VEGF-R2 receptori. U

mlečnim zubima je većina receptora lokalizovana u endotelnim ćelijama neposredno ispod odontoblasta, dok se u stalnim zubima endotelne ćelije sa VEGF-R2 receptorima nalaze ravnomerno distribuirane u pulpi. Roberts–Clark i sar. (60) su pokazali da oslobađanje VEGF tokom progresije karijesa ima značajnu ulogu u reparatornim procesima u pulpo-dentinskom kompleksu. S druge strane, zapaljenski procesi u pulpi i periapikalnim lezijama su praćeni ekspresijom VEGF koji izaziva hemotaksu, ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju (61-64).

### **1.3 VEGF I DM**

Diabetes mellitus (DM) je hronično metaboličko oboljenje koje se karakteriše hiperglikemijom praćenom promenama u metabolizmu ugljenih hidrata, masti i belančevina (65). Etiološki se razlikuju dva tipa ove bolesti: DM tip 1 gde je uzrok hiperglikemije destrukcija  $\beta$  ćelija endokrinog dela pankreasa koja vodi u deficit insulina i DM tip 2 sa hiperglikemijom kao posledicom kombinacije metaboličkih disbalansa (rezistencija na insulinsku aktivnost, relativni insulinski deficit, visoka hepatična produkcija glukoze, neadekvatni kompenzatorni insulinski sekretorni odgovor). Dok DM tip 1 uglavnom nastaje kao autoimuno idiopatsko oboljenje, patogeneza DM tip 2 je kompleksna, a faktori rizika za pojavu su starost, neadekvatna ishrana, nedostatak fizičke aktivnosti i sl. DM tip 2 čini 90 do 95% svih dijagnostifikovanih slučajeva ove bolesti (66).

Najčešće sistemske komplikacije dijabetesa su nefropatija, retinopatija i otežano zarastanje rana, kao posledice mikro i makrovaskulopatija i neuropatija. Mikrovaskularne i makrovaskularne promene u

DM nastaju kao posledica patofizioloških mehanizama koji povećavaju oksidativni stres u tkivu koji leži u osnovi svih dijabetičnih promena.

U ranoj fazi dijabetesa hiperglikemija izaziva mikrovaskularne promene koje karakteriše poremećaj funkcije endotela krvnih sudova uz povećanu propustljivost za makromolekule i proliferaciju ćelija (67). Tada dolazi do smanjenja aktivnosti vazodilatatora i povećanja aktivnosti vazokonstriktora uz oslobađanje faktora, među koje se ubraja i VEGF, koji pospešuju vaskularnu permeabilnost. U daljem toku bolesti nastaje pojačan prolaz plazma proteina kroz endotel i njihovo taloženje u bazalnoj membrani što doprinosi ireverzibilnim promenama na krvnim sudovima (68). Prisutne tkivne promene dovode do edema, ishemije i hipoksije što u retini izaziva neovaskularizaciju, u bubrezima glomeruloskleroza i proteinuriju, a u perifernim nervima multifokalnu aksonsku degeneraciju (69). Lokalno u tkivima, hiperglikemija remeti procese adherencije, hemotakse i fagocitoze kod polimorfonukleara i dovodi do hiperprodukcije proinflamatornih citokina što modifikuje zapaljensku reakciju (70).

Dijabetične makrovaskularne promene, obuhvataju ubrzanu ateroskleroza velikih krvnih sudova koja takodje započinje endotelnom disfunkcijom. U dijabetičnim arterijama, endotelna disfunkcija nastaje kako zbog hiperglikemije tako i zbog insulinske rezistencije. Tada dolazi do ubrzane proliferacije glatkih mišićnih ćelija vaskularnog zida i inhibicije stvaranja NO u endotelnim ćelijama (71). Hiperglikemija i insulinska rezistencija imaju ulogu i u patogenezi dijabetične dislipidemije, sa povećanim nivoima aterogenog holesterola. Sve ove promene značajno povećavaju rizik za nastanak koronarnog srčanog oboljenja i ishemijske bolesti mozga. VEGF kao jedan od najznačajnijih signalnih molekula vezanih za komplikacije DM može biti povišen ili snižen u toku ove bolesti. U nekim organskim sistemima povećan nivo VEGF je stimulus patološke angiogeneze i povezan je sa

tkivnom hipoksijom i sledstvenim povećanjem ekspresije gena za VEGF. Tako, na primer, tokom dijabetične retinopatije nastaju oštećenja krvnih sudova koja dovode do retinalne hipoksije sa povećanom proliferacijom i prosljivošću krvnih sudova kao i povišenim vrednostima VEGF (72,73). Adamis i sar. (74) i Simo i sar. (73) su ukazali na korelaciju izmedju koncentracije VEGF i intenziteta dijabetične retinopatije. Tsai i sar. (75) su uočili vezu izmedju VEGF u sistemsjoj cirkulaciji i dijabetičnih retinopatija. Naime, ovom studijom je utvrđeno značajno uvećanje VEGF iz plazme kod pacijenata sa hipertenzijom i retinopatijom u odnosu na zdrave ispitanike. VEGF i VEGF receptori koji imaju ključnu ulogu u održanju renalne tubularne funkcije, su značajno povišeni i tokom dijabetične nefropatije. Porast VEGF povećava glomerularnu propustljivost i doprinosi pojavi proteinurije što je pokazala studija Lee i sar. (76). Dae i sar. (77) su dokazali značajno povećanje VEGF u bubrezima dijabetičara u odnosu na zdrave ispitanike, kao i da je urinarna ekskrecija VEGF u direktnoj zavisnosti sa stadijumom dijabetične nefropatije i u korelaciji sa klirensom bubrega i promenom sastava urina.

Sa druge strane, sniženi nivo VEGF dovodi do otežanog zarastanja rana i/ili periferne neuropatije i izaziva hroničnu tkivnu inflamaciju koja redukuje broj ćelija i modifikuje njihove odgovore (78). Poznato je da promene u DM kao što su hipoksija, disfunkcija fibroblasta, izmenjena angiogeneza i neovaskularizacija, smanjen imunitet, i neuropatija dovode do poremećaja svih faza tokom zarastanja rana, a posebno utiču na hemostazu, inflamaciju i angiogenezu (79). Kliničke i eksperimentalne studije vezane za uticaj DM na zarastanje rana su prikazale smanjen protok krvi u tkivima rane, poremećaj aktivnosti neutrofila i makrofaga uz sniženu ekspresiju faktora VEGF (79,80). Interesantan je i klinički nalaz Krishnann i sar. (80) gde je praćen uticaj pritiska na zarastanje rane u uslovima DM i uočena snižena koncentracija VEGFa u tkivu rane kod ovih

pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike. Lerman i sar. (81) su prateći sniženu ekspresiju VEGF u fibroblastima kod pacova sa eksperimentalno izazvanim DM uočili da ni hipoksični uslovi značajno ne menjaju koncentraciju VEGF, za razliku od kontrolne grupe gde je hipoksija dovela do značajnog porasta ovog faktora rasta. Značaj VEGF terapije na zarastanje rana je prikazan u studiji Kusumato i sar. (82), gde je pokazano poboljšanje hemodinamske efikasnosti i smanjenje pojava ulcera na koži, bez promena koncentracije VEGF u sistemske cirkulaciji. Značajan je i nalaz Goova i sar. (83) da porast VEGF, nastao inhibicijom receptora za krajnje produkte glikolize, ubrzava zarastanje rana kod životinja sa eksperimentalno izazvanim DM. Howdieshell i sar. (85) su pokazali da se blokiranjem VEGF usporava zarastanje rana.

#### **1.4 VEGF, DM I ORALNA TKIVA**

Dobro dokumentovane kliničke studije pokazuju da je DM povezan sa povećanom incidencijom oralnih poremećaja kao što su: parodontopatija, hipofunkcija pljuvačnih žlezda, različiti oblici stomatitisa, kao i usporeno zarastanje rana. Više faktora koji leže u osnovi DM utiče na incidenciju ovih oralnih poremećaja i to su najverovatnije povećan oksidativni stres, smanjene odbrambene snage, hronična inflamacija, vaskulopatije i poremećena sekrecija pljuvačke.

Oralno oboljenje koje se najčešće povezuje sa dijabetes melitusom je parodontopatija. Nalazi komparativnih kliničkih studija koje se odnose na koncentraciju VEGF u gingivi i tečnosti gingivalnog sulkusa kod DM i sistemski zdravih pacijenata obolelih od parodontopatije su kontradiktorni. Sakalioglu i sar. (86) i Unlu i sar. (87) su kod pacijenata sa DM sa klinički

utvrđenom parodontopatijom pokazali značajno više koncentracije VEGFa u uzorcima gingive u odnosu na sistemski zdrave pacijente sa istim stadijumom parodontopatije. Nasuprot tome, Keles i sar. (88) su pokazali da DM tip 2 u uslovima dobre metaboličke kontrole nema značajan uticaj na ekspresiju VEGF kod pacijenata sa parodontitisom i gingivitisom, obzirom da nisu utvrđene značajne razlike u koncentraciji VEGF u gingivalnim tkivima kod zdravih i pacijenata obolelih od dijabetesa. Guneri i sar. (89) su na osnovu nivoa VEGF u gingivalnim tkivima i tečnosti gingivalnog sulkusa, ukazali da parodontalni status utiče u većoj meri na nivo VEGF nego samo prisustvo DM tip 2. Yki-jarvinen i sar. (90) su pokazali da inflamacija tokom parodontopatije povećava rezistenciju na insulin i dodatno pogoršava mehanizme regulacije glikemije, dok suzbijanjem parodontalne inflamacije dolazi do smanjenja inflamatornih medijatora u krvi, što direktno utiče na rezistentnost insulina i kontrolu glikemije.

Značajna oralna komplikacija DM je poremećaj funkcije pljuvačnih žlezda. Chavez i sar. (91) i Newrick i sar. (92) su pokazali da se u uslovima loše kontrolisanog DM tip 2 značajno smanjuje funkcija parotidne žlezde i protok pljuvačke. Do istog nalaza su došli i Guggenheimer i sar. (93) prateći protok pljuvačke kod pacijenata sa DM tip 2. De Lima i sar. (94) i Collin i sar. (95) nisu pokazali značajne razlike u salivarnom protoku između zdravih i pacijenata sa dobro kontrolisanim DM. Klinička istraživanja su takodje pokazala da pacijenti sa DM tip 2 imaju izraženiju kserostomiju i subjektivni osećaj suvoće usta u odnosu na zdrave ispitanike iste starosti (96). Veliki broj kliničkih studija direktno povezuje kserostomiju izazvanu DM tip 2 sa pojavom različitih oblika stomatitisa (93, 95-98). Guggenheimer i sar. (93) i Collin i sar. (95) su pokazali značajno češće prisustvo ulceracija, fibroma i glositisa kod obolelih od DM tip 2 u odnosu na zdrave osobe. Kod pacijenata sa DM tip 2 je učestala i pojava infekcija izazvana *Candidom albicans* koja se manifestuje

u vidu angularnog heilitisa, eritema i traumatskih ulceracija, što su i pokazale studije (99-101). Osim protoka, na pojavu infekcija kod obolelih od DM utiče i promena u sastavu pljuvačke koja je uočena kod ovih pacijenata i pored dobre kontrole glikemije (102). U pljuvački pacijenata sa nekontrolisanim DM tip 2 su pokazane izmenjene koncentracije kalcijuma, albumina, elektrolita i proteina u odnosu na zdrave ispitanike (103,104).

Neuropatija je najčešća komplikacija koja prati DM tip 2. Collin i sar (95) su uočili visok procenat prisustva periferne i autonomne neuropatije kod ispitanika obolelih od DM tip 2, koja je u odnosu na zdrave ispitanike praćena povišenom incidencom kserostomije, gubitka zuba i TMZ disfunkcije. Kliničke studije su pokazale da autonomne neuropatije utiču na smanjen protok pljuvačke, dok su periferne neuropatije vezane za pojavu bola i gubitka senzacije kod pacijenata sa DM tip 2 (92, 95,98).

Kliničke i eksperimentalne studije su pokazale usporeno i izmenjeno zarastanje postekstrakcionih i hirurških oralnih rana u prisustvu dijabetesa (105,106). Izmenjen nivo inflamatornih citokina i krajnjih produkata glikolize uz povećanu apoptozu fibroblasta se smatraju glavnim uzrokom ove pojave, što je pokazano kako studijama na eksperimentalnim životinjama tako i u kliničkim studijama (111-117). Značajan je i nalaz kliničke studije Aronovich i sar. (112) da i pored dobre kontrole glikemije, se ne može predvideti ni brzina i ni tok zarastanja postekstrakcionih rana kod pacijenata sa DM tip 2.

## 1.5 DM I NOSIOCI ZUBNIH PROTEZA

Imajući u vidu činjenicu da je jedan od značajnih faktora u terapiji DM tip 2 i dobro balansirana i redovna ishrana koja uz antidijabetične lekove omogućuje normoglikemiju, zubne nadoknade imaju veliki značaj za rehabilitaciju izgubljene mastikatorne funkcije kod bezubih i krezubih DM tip 2 pacijenata. Posle ekstrakcije zuba, za razliku od protetskih pacijenata koji nisu oboleli od DM tip 2, imedijatna mobilna zubna proteza predstavlja terapiju izbora kod DM tip 2 pacijenata, jer i u postekstrakcionom periodu omogućava adekvatnu mastikaciju čvrste hrane koja je neophodna za održavanje glikemije. Glavni nedostatak ove vrste zubne nadoknade je gubitak retencije tokom vremena, koji se koriguje podlaganjem i zamenom proteze. Retencija predstavlja otpor proteze silama koje teže da je odvoje od ležišta i direktno zavisi od količine, viskoznosti i površinskog napona pljuvačke koja oblaže proteze kao i osobina potpornih tkiva. Kod pacijenata sa DM tip 2, promene u sastavu i količini pljuvačke, kao i smanjena rezilijencija oralne sluznice su vezane za smanjenu retenciju i stabilnost mobilnih nadoknada što su pokazale i studije (95,113). Poremećaj stabilnosti proteze je glavni etiološki faktor nastanka proteznog stomatitisa čija je povećana incidenca kod nosilaca mobilnih zubnih nadoknada obolelih od DM tip 2 pokazana u brojnim studijama (93,95,99). Većina pacijenata sa proteznim stomatitisom nema subjektivnih tegoba, ali se povremeno mogu javiti zadah, bolovi i pečenje oralne sluznice. Neravne površine akrilatnih proteza dodatno doprinose prijemčivosti za mikroorganizme, a posebno za gljivice što je pokazano u istraživanjima Cumming i sar (114) i Daniluk i sar (115). Nosioci totalnih proteza oboleli od DM tip 2 su pokazali i povećano prisustvo *Candidae albicans* u odnosu na sistemski zdrave ispitanike



istom vrstom zubnih nadoknada (115). Na kvalitet rehabilitacije totalnim protezama u velikoj meri utiče mogućnost oralne sluznice da se prilagodi perzistentnom pritisku neophodnom za retenciju proteze, kao i okluzalnom pritisku nastalom usled funkcija. Ovi akutni i hronični pritisci dovode do reverzibilnih i ireverzibilnih promena mekih i tvrdih potpornih tkiva. Naime, tokom mastikacije, akutni okluzalni pritisak se prenosi sa mobilnih zubnih nadoknada na meka i kostna oralna tkiva i dovodi do pomeranja proteze u vidu intruzije (116). Deformacije tkiva izazvane pomeranjem proteze imaju viskoelastična svojstva i direktno zavise od dužine trajanja pritiska, učestalosti pritiska, vrste prethodnog opterećenja, ali i histoloških i morfoloških karakteristika oralne sluznice koja je u neposrednom kontaktu sa protezom (117). Pritisak izazvan kontinuiranim dejstvom palatinalne ploče izaziva degeneraciju epitelnih ćelija, smanjenje senzornih ćelija i promene u broju osteoklasta i osteoblasta kao odgovor potpornih tkiva na kompresiju što su i pokazala istraživanja na eksperimentalnim životinjama (118,119). Mori i sar. (119) su prateći dejstvo kontinuiranog pritiska na potporna tkiva ispod eksperimentalne palatinalne ploče, uočili korelaciju između intenziteta pritiska i histopatoloških promena sluznice kod eksperimentalnih životinja. Pored histoloških promena, mehanička kompresija izazvana prisustvom proteze je uzrok i smanjenog protoka u krvnim sudovima opterećene sluznice (120). Tsouruka i sar. (121) su pokazali da kompresivno dejstvo eksperimentalne ploče na palatinalnu sluznicu pacova izaziva smanjenje protoka krvi do 10%, uz nastanak hipoksije i povećanu ekspresiju VEGF.

DM menja fiziološki odgovor potpornih tkiva na prisustvo proteze u vidu odložene, ali intenzivnije proliferacije ćelija kako su pokazale studije na animalnom modelu eksperimentalno izazvanog dijabetesa kod pacova, gde su praćene histološke promene u oralnoj sluznici ispod eksperimentalne palatinalne ploče (122-124). Klinička studija Abbas i sar. (125) je takodje pokazala intenzivne

histopatološke promene oralne sluznice ispod baze proteze kod pacijenata obolelih od DM tip 2, kao i gubitak rezilijencije oralne sluznice uz sniženu retenciju proteza kod ovih pacijenata. Za sada, međjutim, nema podataka o molekularnom mehanizmu kojim DM tip 2 izaziva promene oralnih tkiva u prisustvu proteze.

## **2. RADNA HIPOTEZA**

U okviru istraživanja veze između VEGF u pljuvački i gingivi krezubih i bezubih ispitanika sa DM tip 2, rehabilitovanih imedijatnim totalnim zubnim protezama (ITZP) i mehaničkog stresa i oralne homeostaze, postavljena je sledeća radna hipoteza:

Kod ispitanika sa DM tip 2 je povišen nivo VEGF u pljuvački i gingivi ispod ITZP u odnosu na zdrave ljude. Ove promene su u korelaciji sa pritiskom zubne proteze i značajno se odražavaju na pojavu stomatitisa ispod ITZP, kao i na zarastanje rana posle ekstrakcije zuba u preprotetskoj pripremi pacijenata.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Za ispitivanje korelacije između koncentracije VEGF i pritiska ITZP, pojave stomatitisa ispod ITZP i zarastanja rana posle vađenja zuba postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Odrediti koncentraciju VEGF u gingivi sa mesta ekstrakcije zuba (preprotetska priprema) i/ili gingivi na mestu pritiska stare mobilne zubne proteze, kao i sa mesta hirurške korekcije alveolarnog grebena kako kod ispitanika sa DM tip 2, tako i u grupi zdravih ispitanika.
2. Odrediti i ispitati na animalnom modelu pacova vezu između koncentracije VEGF u gingivi ispod kompresivne i akompresivne protezne ploče u grupi životinja sa eksperimentalno izazvanim DM i u kontrolnoj grupi životinja.
3. Ispitati vezu između koncentracije VEGF u pljuvački i toka zarastanja ekstrakcionih rana (nastalih zbog preprotetske hirurške pripreme) kod ispitanika sa DM tip 2 i u grupi zdravih ispitanika.
4. Ispitati vezu između koncentracije VEGF u gingivi i toka zarastanja hirurške rane ispod protezne ploče na animalnom modelu pacova sa eksperimentalno izazvanim DM i u kontrolnoj grupi životinja.
5. Ispitati odnos između koncentracije VEGF u pljuvački i pojave stomatitisa ispod ITZP u toku godinu dana kod ispitanika sa DM tip 2 i u grupi zdravih ispitanika.

## **4. MATERIЈAL I METODE**

## **4.1 KLINIČKO ISTRAŽIVANJE**

Kliničko istraživanje je uradjeno kao kontrolisana, randomizirana, jednostrano-slepa studija po principima *Dobre kliničke prakse*. Ovo istraživanje je obavljeno na Klinici za stomatološku protetiku i na Klinici za oralnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Protokol istraživanja je odobren od strane Etičkog komiteta Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu broj 36/32.

### **4.1.1 Ispitanici**

Klinička studija je obuhvatala 78 ispitanika, oba pola, starosne dobi od 45 do 64 godine upućenih na Kliniku za stomatološku protetiku radi protetske rehabilitacije. Svi ispitanici su bili podeljeni u dve grupe: ispitanici sa diabetes mellitus tip 2 (DM tip 2) i zdravi ispitanici. U grupi ispitanika sa DM tip 2 (ASA II status) bilo je 36 pacijenata koji su lečeni na Klinici za endokrinologiju KBC “Zvezdara” u Beogradu. Kontrolnu grupu je činilo 42 zdrava ispitanika (ASA I status). Opšti kriterijumi za uključivanje ispitanika u ovo kliničko ispitivanje bili su sledeći. Ispitanici su bili nepušači, nosioci gornjih parcijalnih pločastih proteza (PPP) i donjih totalnih proteza (TP) u vremenskom periodu od 5 godina kod kojih je bila indikovana izrada gornje imedijatne totalne zubne proteze (ITZP) uz ekstrakcije zuba sa terminalnim stadijumom parodontopatije, kao i nova donja totalna proteza prema kriterijumima uravnotežene okluzije. Specifični kriterijum za uključivanje ispitanika sa DM tip 2 u



ispitivanje je bila istorija bolesti pacijenata sa trajanjem oboljenja od najmanje 2 godine, kontrolisana glikemija odredjena kroz vrednosti glikoziliranog hemoglobina ( $HbA1C < 9$ ), kao i odsustvo drugih sistemskih bolesti i to najčešćih sistemskih komplikacija osnovnog oboljenja kao što su kardiovaskularne i nefrološke komplikacije.

#### **4.1.2 Faze kliničkog istraživanja**

**Faza 1.** Ova faza je podrazumevala prvi pregled i ispunjavanje kriterijuma o uključivanju ispitanika u ispitivanje. Klinički pregled uz utvrđivanje stanja zuba i mekog tkiva, kao i stanja starih parcijalnih pločastih proteza uz postavljanje protetske indikacije za izradu ITZP je obavljen na Klinici za stomatološku protetiku i na Klinici za oralnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Obzirom da je odsustvo inflamacija mekog tkiva bilo značajan kriterijum za uključivanje u studiju, radi smanjenja zapaljenske reakcije u mekom tkivu i parodontijumu, svim ispitanicima je bila uradjena kiretaža džepova, uklanjanje čvrstih i mekih naslaga uz višednevno ispiranje usta 0,12% rastvorom hlorheksidina. Pregled proteza je podrazumevao utvrđivanje stepena higijene i individualnog osećaja stabilnosti zubnih nadoknada.

**Faza 2.** Po smirivanju zapaljenske reakcije u mekom tkivu, ispitanicima su uzeti otisci radi izrade ITZP. Sledio je uobičajen niz kliničkih faza koji je obuhvatao uzimanje funkcionalnog otisaka, odredjivanje medjuviličnih odnosa i proba postave zuba. U ovoj fazi ispitivanja, ispitanicima je uzet i uzorak nestimulisane pljuvačke radi utvrđivanja koncentracije VEGF.

**Faza 3.** Hirurška preprotetska priprema ispitanika koja je podrazumevala ekstrakcije po 3 zuba premolarne i frontalne regije u gonjoj vilici u lokalnoj anesteziji 3% mepivakainom bez vazokonstriktora (Scandonest<sup>®</sup>, Septodont, Francuska) obavljena je na Klinici za oralnu hirurgiju, Stomatološkog fakulteta u Beogradu. Tom prilikom su uzeti uzorci gingive (2 uzorka) iz predela zuba koji se vadi, po metodi koju su opisali Sakallioğlu i sar. (86): 1) sa mesta pritiska stare mobilne zubne nadoknade (komprimovani deo mekog tkiva) i 2) sa mesta gde stara proteza nije pokrivala gingivu (akomprimovani deo mekog tkiva). Uzorci tkiva su korišćeni radi utvrđivanja koncentracije VEGF u gingivi. Neposredno posle vađenja zuba, na Klinici za stomatološku protetiku, pacijentima je predana ITZP. Svi pacijenti su dobili neophodna uputstva o nošenju proteze, neophodnim kontrolnim pregledima, kao i kontroli bola u toku narednih nekoliko dana nošenja ITZP.

**Faza 4.** U ovoj fazi kliničkog ispitivanja praćeni su parametri zarastanja postekstrakcione rane i to: epitelizacija otvora alveole, promene na gingivi i oralnoj mukozi posle vadjenja zuba i nošenja ITZP, kao i kvalitet nošenja ITZP.

**Klinička metoda praćenja epitelizacije otvora alveole.** Proces zarastanja rana ispod IMZP je praćen svakodnevno, da bi se utvrdila kompletna epitelizacija otvora alveole, primenom jednokrakog šestara. S tim u vezi, registrovan je dan kompletne epitelizacije otvora alveole.

**Klinička metoda praćenja pojave lezija mekog tkiva u periodu zarastanja postekstrakcione alveole.** U observacionom periodu 3, 7, 14, i 21 dana posle vadjenja zuba, registrovane su promene na pripojnoj i marginalnoj gingivi, kao i prisustvo mukoznih lezija. Gingivalna hiperemija je rangirana sa tri stepena: slaba, srednja i jaka, dok je prisustvo ulceracija i nekroza gingive označeno sa: prisutno i nije prisutno.

**Klinički metod kvantifikacije postekstrakcionog bola.** Pojava postekstrakcionog bola je merena 100 mm vizuelnom analognom skalom (VAS) sa krajnjim tačkama „bez bola“ i “neizdrživ bol“, kao i verbalnom analognom skalom (VRS) na osnovu 6 opisanih bolnih intenziteta postavljenih u kontinuitetu:

- |                        |                        |
|------------------------|------------------------|
| 1 - bez bola           | 4 - bol srednje jačine |
| 2 - jedva osetljiv bol | 5 - jak bol            |
| 3 - slab bol           | 6 - neizdrživ bol.     |

Pacijentima su data uputstva o korišćenju ibuprofen 400mg per os (Brufen, Galenika, Beograd, Srbija), kao analgetika u postekstrakcionom periodu.

**Klinički metod praćenja kvaliteta nošenja ITZP.** U istom observacionom periodu (3 nedelje), praćen je kvalitet života nosioca ITZP, registrovanjem svih nelagodnosti izazvanih prisustvom ITZP. Korekturama proteza u vidu uklanjanja akrilata sa bolnih mesta su se olakšavale tegobe koje su onemogućavale nošenje proteze. Postupcima reokludacije su korigovani okluzija i stabilizacija proteze. Praćena je mogućnost korišćenja proteze u funkciji, odnosno pri govoru i jelu. Dobra retencija je podrazumevala mirovanje proteze tokom mirovanja, govora i jela. Nakon perioda od tri nedelje, pacijenti su dolazili na kontrole po potrebi. Proteze su podlagane tvrdim autopolimerizujućim akrilatom u slučajevima gubitka retencije i stabilizacije.

**Faza 5.** Nakon vremenskog perioda od godinu dana, obavljen je kontrolni pregled svih pacijenata kako bi se utvrdilo eventualno prisustvo proteznog stomatitisa.

**Klinički metod dijagnostikovanja proteznog stomatitisa i faktora rizika za nastanak proteznog stomatitisa (higijena i stabilnost proteza).** Pojava proteznog stomatitisa utvrđena kliničkim pregledom godinu dana posle predaje ITZP je rangirana prema Newton klasifikaciji (126):

1. Newton tip I – tačkasta hiperemija: mala područja inflamacije u zdravom tkivu.
2. Newton tip II – difuzna hiperemija: generalizovana hiperemija tkiva ispod proteze. Površina mekog tkiva je glatka i neznatna trauma može izazvati krvarenje.
3. Newton tip III – papilarna hiperplazija: nodularna, hiperemična površina mukoze koja može biti prisutna u celom potpornom tkivu proteze, ali je češće zastupljena u centralnim regijama.

Higijena i stabilnost zubnih nadoknada su ocenjivani kako pre terapijskih postupaka za zbrinjavanje pacijenata ITZP, tako i posle godinu dana nošenja ITZP.

Higijena proteza je određena objektivnim pregledom na osnovu modifikovane Hoad-Reddick skale (127).

Oznaka “Dobro“ je podrazumevala proteze bez vidljivih naslaga, a “Loše” proteze sa naslagama koje nisu mogle da se uklone ispiranjem vodom.

Stabilnost proteze je definisana subjektivnim osećajem ispitanika i rangirana sledećim kategorijama: “Dobro“ ukoliko su proteze mirovale prilikom funkcija i “Loše” u slučaju pomeranja proteze u funkciji.

### 4.1.3 Detekcija salivarnog i tkivnog VEGF

Za kvantitativno merenje nivoa VEGF u humanim uzorcima pljuvačke i tkiva korišćen je komercijalni ELISA kit, RayBio® Human VEGF ELISA Kit (RayBiotech. Inc, USA) prema uputstvu proizvođača.

**ELISA test.** ELISA je vrsta biohemijske analize koja se koristi za kvalitativno i kvantitativno određivanje supstanci, obično proteina, u heterogenim rastvorima. Osnova ovog analitičkog postupka je imunohemijska reakcija antigen-antitelo. Esej se obično dizajnira tako da se ispitivana supstanca ponaša kao antigen koji se tokom analize vezuje za njemu specifično primarno antitelo prisutno u analitičkom sistemu formirajući kompleks antigen-antitelo. Količina stvorenih kompleksa proporcionalna je količini prisutnog antigena koji se ispituje. Da bi se utvrdilo prisustvo i količina kompleksa antigen-antitelo uvodi se sekundarno antitelo za koje je vezan (konjugovan) enzim kao „reporterni“ molekul. Funkcija enzima je da učini ovaj kompleks detektabilnim. Naime, u reakcionom rastvoru se u ovoj fazi dodaje enzimu specifičan supstrat koji u reakciji menja boju. Intenzitet boje je izraženiji što je veća količina prisutnog enzima. Obzirom da je intenzitet enzimske reakcije definisan količinom stvorenog kompleksa primarno antitelo-antigen–sekundarno antitelo ovo predstavlja osnovu za preciznu kvantitativnu procenu posmatrane supstance. Merenjem intenziteta svetlosti određene talasne dužine propuštene kroz reakcionu rastvor dobija se fizička osnova za izračunavanje prisustva ili koncentracije posmatrane supstance.

Izračunavanje koncentracija VEGF je obavljeno na osnovu standardnih kriva konstruisanih za svaki izvedeni esej. Naime, u odgovarajuće reakcione komore mikrotitracionih pločica pipetirani su i

rastvori VEGF poznate koncentracije (standard) u serijskom razblaženju, čime je dobijena vrednost optičke gustine (OD) za poznatu koncentraciju. Korišćenjem programa Sigma Plot 12 (SyStat Software Inc, IL, USA) određena je formula standardne krive koja je reprezentovala dobijene vrednosti i pomoću nje su se na osnovu izmerenih OD izračunavale nepoznate koncentracije VEGF u uzorcima. Za svaki uzorak (i standard) su obavljena po dva merenja i krajnja koncentracija uzorka (standarda) je izračunata kao njihova srednja vrednost.

#### **4.1.3.1 Kvantifikacija VEGF u uzorcima pljuvačke**

Sakupljanje uzoraka pljuvačke je obavljeno prilikom uzimanja otisaka za izradu ITZP (Faza 2), trećeg dana nakon ekstrakcije zuba i predaje ITZP (faza 3), kao i prilikom dijagnostikovanja oralnih manifestacija proteznog stomatitisa pri kontrolnom pregledu nakon godinu dana (faza 5). Pacijenti su u toku 5 minuta ispljuvali pljuvačku u sterilnu posudu. Dobijeni uzorci su bili čuvani u tečnom azotu, a zatim zamrznuti na temperaturu od  $-80^{\circ}\text{C}$  do sledstvene analize.

Nakon odmrzavanja, uzorcima pljuvačke precizno je izmerena masa. Za kvantitativno merenje VEGFa korišćen je komercijalni ELISA kit, RayBio<sup>®</sup> Human VEGF ELISA Kit (RayBiotech, Inc, USA) za serum i pljuvačku. Biohemijske reakcije su se odvijale na mikrotitracionim pločicama obezbeđenim u okviru korišćenih kompleta. Svaka mikrotitraciona pločica je imala 96 reakcionih komora pokrivenih imobilisanim primarnim antitelima za VEGF. U svaku komoru je uneta propisana količina uzorka ili standarda (rekombinantni humani VEGF). Posle unošenja uzorka u komore, VEGF prisutan u uzorku se vezivao za ploču imobilizacijom antitela. Nakon ispiranja,

dodata su biotinizirana anti humana VEGF antitela. U daljem postupku, uklonjena su nevezana biotinizirana antitela uz dodavanje HRP-konjugovanog streptavidina (streptavidin konjugovan sa *horseradish peroxidase*). Posle novog ispiranja, dodat je tetrametilbenzidin (TMB) rastvor. Pod dejstvom enzima doslo je do promene boje u plavu, pri čemu je intenzitet boje zavisio od koncentracije posmatranog faktora rasta u uzorku. U poslednjem koraku, enzimska reakcija je prekinuta 2N sumpornom kiselinom, pri čemu se boja reakcionih rastvora menjala iz različitih intenziteta plave u različite intenzitete žute boje. Očitavanje absorbanci, odnosno optičkih gustina (OD) rastvora urađeno je odmah po prekidu reakcija na aparatu Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

#### **4.1.3.2 Kvantifikacija VEGF u uzorcima gingive**

Tokom hirurške preprotetske pripreme, uzeti su uzorci gingive veličine 2mm oko zuba koji su bili indikovani za vadjenje. Kod svakog pacijenta uzeta su po dva uzorka tkiva, akompresivni i kompresivni uzorak. Akompresivni uzorak je predstavljao deo mukoze koji nije bio komprimovan starom protezom, a kompresivni je poticao od tkiva koji je bio pod pritiskom proteze. Svi uzorci gingive su uneti u *Ependorf* epruvete sa fiziološkim rastvorom i postavljeni u tečni azot, a zatim zamrznuti na temperaturi od  $-80^{\circ}\text{C}$  do početka laboratorijske analize.

Tkivni uzorci su precizno izmereni neposredno nakon odmrzavanja. Za kvantitativno merenje VEGF u gingivi je korišćen komercijalni ELISA kit, RayBio<sup>®</sup> Human VEGF ELISA Kit (RayBiotech, Inc, USA) za ćelijski i tkivni lizat. Obzirom da tkivni uzorci nisu bili u rastvoru, morali su da se

prevedu u tečnu fazu da bi mogao da se primeni ELISA metod. U ovom istraživanju, tkivo je prevedeno u tečni oblik postupkom liziranja, tako što je u epruvete sa uzorcima uneta odgovajuća količina pufera za lizu tkiva, (500  $\mu$ l/10mg tkiva-uputstvo proizvođača) obezbeđenim u kompletima za analize VEGF faktora rasta. Tkivo je zatim manuelno homogenizovan staklenim štapićima odgovarajuće veličine, u individualnim epruvetama na temperaturi od 4<sup>0</sup>C. Nakon ovoga, lizat je centrifugiran na 5000 obrtaja u trajanju od 10 min. u mikrocentrifugi Heraeus\* Biofuge Primo R (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). U daljem postupku su pripremljeni rastvori biotiniziranog anti humanog VEGF i HRP-konjugovani streptavidin. Posle pripreme reagenasa, u određene komore na mikroploči sipan je standard (rekombinantni humani VEGF), a u ostale pripremljeni uzorci. Faza inkubacije pokrivenih komora trajala je 2,5 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega su komore bile isprane puferom i osušene. U svaku komoru je dodat rastvor biotin antitela uz inkubaciju, ispiranje puferom i sušenje. U daljem postupku je sipan rastvor streptavidina uz inkubaciju, a nakon toga i rastvor tetrametilbenzidina. U poslednjem koraku enzimska reakcija je prekinuta 2N sumpornom kiselinom, pri čemu se boja reakcionih rastvora menjala iz različitih intenziteta plave u različite intenzitete žute boje. Očitavanje absorbanci, odnosno optičkih gustina (OD) rastvora urađeno je odmah po prekidu reakcija na aparatu Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).



## 4.2 ISTRAŽIVANJE NA LABORATORIJSKIM ŽIVOTINJAMA

### 4.2.1 Laboratorijske životinje

Rad sa laboratorijskim životinjama uradjen je po principima *Dobre laboratorijske prakse* na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Ispitivanje je izvedeno na 80 pacova Wistar soja, oba pola, telesne mase 220 do 250 g. Tokom eksperimenta pacovi su se čuvali u kavezima od po 5 životinja. Na raspolaganju im je bila sveža voda za piće i hrana *ad libitum*. Čuvanje životinja tokom eksperimenta je bilo po principima Evropske konvencije za zaštitu životinja koje se koriste u eksperimentima i za druge naučne razloge (CoE-ETS 123). Radi ispitivanja, sve životinje su bile podeljene u dve grupe, eksperimentalnu i kontrolnu, a svaka grupa u četiri podgrupe. Eksperimentalna grupa, koja se sastojala od 40 pacova sa eksperimentalno izazvanim DM je bila podeljena na podgrupe od po 10 pacova na sledeći način:

- 1) pacovi sa kompresivnom palatinalnom pločom i hirurškom ranom (n=10)
- 2) pacovi sa kompresivnom palatinalnom pločom bez hirurške rane (n=10)
- 3) pacovi sa akompresivnom palatinalnom pločom i hirurškom ranom (n=10)
- 4) pacovi sa akompresivnom palatinalnom pločom bez hirurške rane (n=10).

Kontrolnu grupu je sačinjavalo 40 zdravih pacova koje su bile podeljene na isti način kao eksperimentalna grupa sa DM.

### **Indukcija DM**

U eksperimentalnoj grupi pacovima je izazvan DM jednom dozom (150mg/kg) alloxana intraperitonealno. Nedelju dana nakon primene alloxana, određen je nivo glukoze u krvi uzete iz repne vene. Hiperglikemiju je predstavljao nivo veći od 7 mmol/l. Kontrolnoj grupi pacova ubrizgana je ista količina fiziološkog rastvora i takodje izmeren nivo glukoze u krvi posle 7 dana.

### **4.2.2 Faze istraživanja na animalnom modelu pacova**

**Faza 1.** Neposredno pre izrade eksperimentalne ploče, svaka životinja je bila anestetizirana opštom injekcionom anestezijom zoletil 50 (tiletamin hidrohlorid+ zolazepam) u dozi 35-40 mg/kg telesne mase intramuskularno. Precizni otisak gornje vilice je uzet adiconim silikonom, a model vilice je načinjen od poboljšanog tvrdog gipsa (tip 4). Radi izrade kompresivne eksperimentalne ploče, parče voska debljine 0,6mm je postavljeno na model preko okluzalnih površina molara. Preko voska je načinjena akrilatna ploča koja je bila ekstenđirana duž palatuma od prvog do trećeg molara sa obe strane vilice. Nakon polimerizacije akrilata, vosak je uklonjen i sa unutrašnje strane ploče dodat akrilat radi fiksacije ploče za molare i sluzokožu. U daljem postupku, palatinalna ploča je bila postavljena na nepce pod kompresijom i fiksirana. Akompresivna palatinalna ploča je takodje bila načinjena na modelu vilice i postavljena bez kompresije preko molara i nepčane sluzokože (121).

**Faza 2.** U grupama gde je planirano ispitivanje koncentracije tkivnog VEGF ispod protezne ploče u prisustvu eksperimentalne rane, životinjama je pre postavljena eksperimentalne ploče načinjen hirurški rez na sluznici. Rez je bio dužine 4mm i prostirao se sredinom nepca do periosta. Životinje su bile žrtvovane anestetikom zoletil 50 u letalnoj dozi 600mg/kg telesne mase 72 sata posle postavljanja proteze.

### **4.2.3 Detekcija tkivnog VEGF kod pacova**

Za kvantitativno merenje nivoa VEGF u mekom tkivu pacova korišćen je komercijalni ELISA kit, RayBio® Rat VEGF ELISA Kit (RayBiotech. Inc, USA).

Biološki materijal mekog tkiva pacova je uzet sa kompresivnih i akompresivnih mesta na kojima je ležala palatinalna ploča posle žrtvovanja životinja i odvajanja eksperimentalnih ploča od nepca. Postupci kvantifikacije tkivnog VEGF su sprovedeni u svim uzorcima prema uputstvu proizvođača, na istovetan način kao određivanje tkivnog VEGF u humanoj gingivi.

### 4.3 STATISTIČKA ANALIZA

Rezultati su prikazani u obliku procenta, srednjih vrednosti  $\pm$  S.E.M, pri čemu N označava broj ispitanika. Podaci su analizirani u programu Graph Pad Prim verzije 5.0 za Windows. Za proveru Gausove distribucije ispitanika korišćen je D' Agostino i Pearson test normalnosti. Učestalost pojave proteznog stomatitisa u kontrolnoj i DM tip 2 grupi ispitanika je analizirana Che-squared testom. Razlike u koncentraciji VEGFa u pljuvački u obe ispitivane grupe u različitim vremenskim intervalima (pre predaje proteze, trećeg dana posle ekstrakcija i predaje proteze i nakon godinu dana kod ispitanika sa manifestovanim proteznim stomatitismom) su analizirane t-testom, kao i ANOVA testom uz Bonferroni test korekcije. Parametri zarastanja su praćeni t-testom, (zatvaranje otvora alveole i VAS), Mann-Whitney testom (vreme epitelizacije), Chi-squared testom (hiperemija gingive i VRS) i Fisherovim testom (nekroza gingive i ulceracije). Razlike u koncentraciji VEGFa u pripojnoj gingivi zdravih i DM tip 2 pacijenta ispod proteza, kao u zonama koje nisu bile prekrivene protezom su analizirane ANOVA testom uz Bonferroni test korekcije. Za poredjenje rezultata dobijenih iz palatinalne sluzokoze pacova, takodje je korišćen ANOVA test uz Bonferroni test korekcije. Vrednosti  $p < 0.05$  su smatrane statistički značajnim.

## **5. REZULTATI**

## 5.1 KLINIČKO ISTRAŽIVANJE

### 5.1.1 Karakteristike ispitanika

Tabela broj 1 prikazuje demografske karakteristike ispitanika uključenih u istraživanje, kao i dužinu nošenja PPZP. Statistička analiza je ukazala na homogenost ispitivanih grupa, odnosno, zdravi ispitanici i ispitanici sa DM tip 2 se nisu značajno razlikovali u polnoj raspodeli, starosti i dužini nošenja PPZP. Kada su u pitanju karakteristike ispitanika sa DM tip 2, u ovom istraživanju prosečno trajanje DM tip 2 se kretalo u intervalu od 4-5 godina, sa kontrolisanim vrednostima glikemije HbA1c.

Tabela 1. Karakteristike ispitanika

Parametri	Ispitanici	
	Zdravi	DM tip 2
N	42	36
Starost (godine) <sup>α</sup>	56,5±4,3	57,3±3,4
Pol(m/ž) <sup>α</sup>	30/12	22/14
Dužina nošenja PPZP <sup>α</sup>	5,7±0,3	6,2±0,2
Trajanje DM tip 2 <sup>α</sup>	/	4,2±2,1
HbA1c (%) <sup>α</sup>	/	8,7±0,8

<sup>α</sup> srednja vrednost± SD, P>0.05, poredjenje zdravi vs DM tip 2 (Chi-squared test)

Tabela 2 prikazuje karakteristike PPZP, nošene duže od 5 godina i karakteristike ITZP nošene godinu dana, kako kod zdravih ispitanika, tako i kod ispitanika sa DM tip 2. Rezultati pokazuju statistički značajno lošiju stabilnost PPZP u odnosu na ITZP kod svih ispitanika. Statistički manja stabilnost PPZP pokazana je kod ispitanika sa DM tip 2 u odnosu na zdrave ispitanike.

Obe grupe ispitanika su pokazale značajno lošiju higijenu PPZP u odnosu na ITZP. Između zdravih ispitanika i ispitanika sa DM tip 2 nije uočena značajna razlika u higijeni niti PPZP, ni ITZP.

Tabela 2. Karakteristike proteza: PPZP pre kliničkih postupaka i ITZP posle godinu na nošenja

Karakteristike proteza				
Parametri (N)	Zdravi (42)		DM tip 2 (36)	
	nošenje PPZP duže od 5 godina	posle godinu dana nošenja ITZP	nošenje PPZP duže od 5 godina	posle godinu dana nošenja ITZP
Stabilnost proteze				
Dobro/ Loše	22/20	31/11 <sup>§</sup>	11/24*	17/18 <sup>§*</sup>
Higijena proteze				
Dobro/ Loše	22/20	34/8 <sup>§</sup>	14/21	25/10 <sup>§</sup>

<sup>§</sup>P<0.05, poredjenje unutar grupe, nošenje PPZP vs nakon godinu dana nošenja ITZP (t-test),

\*P<0.05, zdravi vs DM tip 2 (Chi-squared test)

### **5.1.2 Kvalitet zarastanja postekstrakcionih rana u toku nošenja ITZP**

Dobijeni rezultati pokazuju nekoliko kliničkih parametara kvaliteta zarastanja postekstrakcionih rana u toku nošenja ITZP kod zdravih ispitanika i ispitanika sa DM tip 2. Analizirani su sledeći parametri:

1. ukupno vreme epitelizacije otvora alveole;
2. dinamika zatvaranja otvora alveole;
3. promene na gingivi alveolarnog grebena i alveolarnoj mukozi i
4. pojava postekstrakcionog bola.

Tabela broj 3 prikazuje vreme epitelizacije postekstrakcionih rana kod zdravih ispitanika i ispitanika sa DM tip 2, nosilaca ITZP. Rezultati pokazuju statistički značajno duže vreme epitelizacije postekstrakcionih rana kod ispitanika sa DM tip 2 u odnosu na grupu zdravih ispitanika.



Tabela 3. Vreme epitelizacije postekstrakcionih rana ispod ITZP kod zdravih ispitanika i ispitanika sa DM tip 2

Ispitanici	N	Ukupno vreme epitelizacije (dani) ( $\bar{X} \pm SD$ )
Zdravi	42	16,9 ± 0,3
DM tip 2	36	19,8 ± 0,5****

\*\*\*\* P<0.0001, poredjenje zdravi vs DM tip 2 (Mann-Whitney test)

Statistički značajna razlika između zdravih ispitanika i ispitanika sa DM tip 2 zapaža se u odnosu na smanjenje dijametra alveole u observacionom periodu od 21 dana u uslovima nošenja ITZP. Smanjenje otvora alveole kod zdravih ispitanika u periodima između 0. i 3. dana, 3. i 7. dana, 7. i 14. dana i 14. i 21. dana posle vadjenja zuba iznosi 15%, 36%, 67%, odnosno 14%. Sa druge strane, kod ispitanika sa DM tip 2 smanjenje dijametra alveole u posmatranim vremenskim intervalima iznosi 8%, 26%, 44%, odnosno 79%. Statistički značajna razlika u veličini otvora alveole između zdravih ispitanika i ispitanika sa DM tip 2 je registrovana 7, 14. i 21.dana posle vadjenja zuba (tabela 4).

Tabela 4. Dijametar otvora postekstrakcione alveole ispod ITZP tokom zarastanja postekstrakcionih rana u grupi zdravih ispitanika i ispitanika sa DM tip 2

Dijametar otvora alveole (mm) $\bar{X} \pm SD$						
Ispitanici	Vreme observacije					
	(N)	0. dan	3. dan	7. dan	14. dan	21. dan
Zdravi		6,57±0,18	5,54±0,24	3,54±0,27	1,16±0,10	0,1±0,04
DM tip 2		6,62±0,16	6,05±0,13	4,45±0,21**	2,47±0,10**	0,5±0,08**

\*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001, poredjenje zdravi vs DM tip 2 (T-test)

U tabeli 5 prikazani su parametri kvaliteta zarastanja mekog tkiva: pojava gingivalne hiperemije, nekroze i ulceracija u observacionom periodu od 21 dana. Veličina hiperemije gingive je bila statistički značajno veća za 30% kod ispitanika sa DM tip 2 u odnosu na zdrave ispitanike 3. i 7. dana posle vadjenja zuba. Učestalost gingivalne nekroze i ulceracija je bila statistički značajno veća kod ispitanika sa DM tip 2 u odnosu na zdrave ispitanike 3. i 14. dana posle ekstrakcija zuba. Slična učestalost nekrotičnih i ulceroznih promena na gingivi kod ispitanika sa DM tip 2 i kod zdravih ispitanika zapaženi su 7. observacionog dana. Nekrotične promene u gingivi registrovane su 21. observacionog dana samo kod ispitanika sa DM tip 2 (tabela 5).

Tabela 5. Parametri kvaliteta zarastanja mekog tkiva ispod ITZP u grupi zdravih ispitanika i ispitanika sa DM tip 2

Parametri kvaliteta zarastanja mekog tkiva ( $\bar{X} \pm SD$ )						
Vreme observacije	Ispitanici		Ispitanici		Ispitanici	
	Zdravi	DM tip 2	Zdravi	DM tip 2	Zdravi	DM tip 2
(N)	Zdravi	DM tip 2	Zdravi	DM tip 2	Zdravi	DM tip 2
0. dan	1	1	0	0	0	0
3. dan	1,35±0,08	1,91±0,13*	0	31,4*	21,4	42,8*
7. dan	1,43±0,08	2,0±0,10*	42,8	40,0	41,0	57,1
14. dan	1	1,11±0,05	0	20,0*	0	11,4*
21. dan	1	1	0	20,0*	0	0

\* $P < 0.05$ , poredjenje zdravi vs DM tip 2 (Chi-squared: gingivalna hiperemija, Fisher test: gingivalna nekroza i ulceracija)

U tabeli 6. je prikazan intenzitet bola meren vizuelnom analognom skalom (VAS) i verbalnom analognom skalom (VRS) kod zdravih ispitanika i DM tip 2 ispitanika, nosilaca ITZP. Najintenzivniji bol posle vadjenja zuba izmeren kako VAS, tako i VRS skalom registrovan je 3. dana u obe ispitivane grupe. Intenzitet postekstrakcionog bola je značajno veći kod ispitanika sa DM tip 2, 3., 7. i 21. dana u odnosu na bol kod zdravih ispitanika. Značajna razlika u intenzitetu postekstrakcionog bola izmedju ispitivanih grupa ne postoji samo 14. dana observacionog perioda.

Tabela 6. Intenzitet bola meren vizuelnom analognom skalom (VAS) i verbalnom analognom skalom (VRS) kod zdravih ispitanika i ispitanika sa DM tip 2, nosilaca ITZP

Parametri kontrole bola (X±SD)				
Vreme observacije	VAS(mm)		VRS (1-6)	
	Ispitanici			
(N)	Zdravi (42)	DM tip 2 (36)	Zdravi (42)	DM tip 2 (36)
Pre ekstrakcije i predaje proteze	0	0	0	0
3.dan	35,1±2,8	53,4±4,39*	3,21±0,14	4,14±0,16*
7.dan	29,1±2,8	50,8±4,22**	2,92±0,17	3,8±0,17*
14.dan	12,9±2,1	19,8±4,47	2,09±0,13	2,4±0,2
21.dan	0	2,17±0,43*	1,0	1,4±0,08*

\*P<0.01,\*\*P<0.001, poredjenje zdravi vs DM tip 2 (T-test: VAS, Chi-squared test: VRS)

### 5.1.3 VEGF u pljuvački i VEGF u gingivi kod nosilaca ITZP

U tabeli broj 7 su prikazane koncentracije VEGF u pljuvački pre ekstrakcije zuba i 3. dan posle ekstrakcija zuba kod zdravih ispitanika i ispitanika sa DM tip 2. Koncentracija VEGF u pljuvački je bila značajno veća 3.dan posle ekstrakcija zuba, kako kod zdravih ispitanika tako i kod ispitanika sa DM tip 2 u odnosu na koncentraciju VEGF izmerenu pre ekstrakcija. Ovo povećanje kod ispitanika sa DM tip 2 je iznosilo 3,2 puta, a kod zdravih ispitanika 2,7 puta. Koncentracija VEGF u pljuvački kod ispitanika sa DM tip 2 je bila statistički značajno veća u odnosu na zdrave ispitanike kako pre, tako i 3 dana posle ekstrakcija zuba (3,6 puta i 4,2 puta).

Tabela 7. Koncentracije VEGF u pljuvački pre ekstrakcije zuba i treći dan posle ekstrakcija zuba kod zdravih ispitanika i ispitanika sa DM tip 2

---

<u>Koncentracije VEGF (pg/ml) X±SD</u>			
Ispitanici	N	Pre ekstrakcija	3 dana posle ekstrakcija
Zdravi	42	168,2 ± 21,6	460,3 ± 65,1 §§
DM tip 2	36	615,5 ± 63,7***	1963,0 ± 134,3 §§***

---

§§ P<0.001, poredjenje u unutar grupe,\*\*\* P<0.001 poredjenje izmedju zdravi vs DM (ANOVA, Bonferroni post hoc test)

U tabeli broj 8 su prikazane koncentracije VEGF u gingivi u trenutku vadjenja zuba kod zdravih ispitanika i ispitanika sa DM tip 2, nosilaca PPZP više od 5 godina. Koncentracije VEGF kod obe grupe ispitanika su poticale iz uzoraka gingive koja nije bila prekrivena protezom, (akompresivni deo), kao i iz gingive koja je bila komprimovana protezom (kompresivni deo). Koncentracije VEGF u kompresivnom delu gingive su bile značajno manje, kako u grupi zdravih ispitanika, tako i kod ispitanika sa DM tip 2, u odnosu na koncentracije VEGF iz akompresivne njihove gingive. Naime, u grupi zdravih ispitanika koncentracija VEGF u kompresivnom delu gingive je bila za 28%, a kod ispitanika sa DM tip 2 za 66% manja u odnosu na koncentracije ovog faktora rasta u akompresivnom delu gingive. Poredjenjem koncentracije VEGF kod zdravih ispitanika i ispitanika sa DM tip 2, statistički značajna razlika se zapaža samo u isečcima kompresivne gingive (tabela 8).

Tabela 8. Koncentracije VEGFa u gingivi u uslovima akompresije i kompresije PPZP kod zdravih ispitanika i ispitanika sa DM tip 2

		Koncentracije VEGF (pg/ml)	
		X±SD	
Ispitanici	N	Akompresivni deo gingive	Kompresivni deo gingive
Zdravi	42	37,64± 3,0	27,18±1,0*
DM tip 2	36	37,44± 4,93	12,58±1,21***§

\*P< 0.05, \*\*\* P<0.001, poredjenje kompresija vs akompresija, § P<0.05, poredjenje zdravi vs DM tip 2 (ANOVA, Bonferroni post hoc test)

## **5.1.4 Protezni stomatitis u toku nošenja ITZP**

### **5.1.4.1 Faktori rizika za pojavu proteznog stomatitisa**

Učestalost proteznog stomatitisa utvrđenog posle godinu dana nošenja ITZP je iznosila 49% od ukupnog broja svih ispitanika uključenih u studiju (tabela 9). U tabeli 9 su takodje prikazani faktori rizika za nastanak proteznog stomatitisa: higijena proteze, stabilnost proteze, kao i prisustvo DM tip 2, kako kod ispitanika sa proteznim stomatitisom, tako i kod ispitanika bez ove pojave. Loša stabilnost proteza i prisustvo DM tip 2 su bili značajno povezani sa pojavom proteznog stomatitisa, za razliku od higijene proteze. Naime, između ispitanika sa proteznim stomatitisom i ispitanika bez proteznog stomatitisa nije bilo značajnih razlika u higijeni ITZP. Statističke analize nisu uključile starost i pol kao faktore rizika, obzirom da su ispitanici pokazivali homogenost po pitanju starosti (45-64) i da su ispitanici bili uglavnom muškog pola (69%).



Tabela 9. Faktori rizika za pojavu proteznog stomatitisa kod ispitanika sa i bez znakova proteznog stomatitisa posle godinu dana nošenja ITZP

Faktori rizika	Protezni stomatitis	
	Bez kliničke manifestacije (N=40)	Sa kliničkom manifestacijom (N=38)
Higijena proteze:		
loše/dobro	8/32	11/27
Stabilnost proteze:		
loše/dobro	9/31	21/17**
DM tip 2:		
Da/Ne	14/26	22/16*

\*P<0.05, \*\* P<0.001, poredjenje bez kliničke manifestacije vs sa kliničkom manifestacijom (Chi-squared test)

Kod ispitanika sa proteznim stomatitisom su uočeni Newton tip I (65,8%) i Newton tip II (35,2%), dok Newton tip III protezni stomatitis nije bio prisutan kod ispitanika uključenih u istraživanje.

Stabilnost proteze kao faktor rizika, nasuprot higijeni proteze i DM tip 2 je bio značajno povezan sa pojavom proteznog stomatitisa Newton tip I i Newton tip II (tabela 10).

Tabela 10. Faktori rizika za pojavu proteznog stomatitisa kod ispitanika sa proteznim stomatitisom Newton tip I and Newton tip II posle godinu dana nošenja ITZP

Parametri	Protezni stomatitis (n = 38)	
	Newton tip I	Newton tip II
N	25	13
Higijena proteze:		
loše/dobro	6/19	5/8
Stabilnost proteze:		
loše/dobro	10/15	11/2*
Ispitanici:		
DM tip 2/ Zdravi	14/11	8/5

\*P<0.05, poredjenje Newton tip I vs Newton tip II (Chi-squared test)

Poredjenje učestalosti i faktora rizika za pojavu proteznog stomatitisa kod zdravih ispitanika i ispitanika sa DM tip 2, nosilaca ITZP je pokazano tabelom broj 11. Značajno veća zastupljenost proteznog stomatitisa je bila prisutna kod ispitanika sa DM tip 2 (61%) u odnosu na zdrave

ispitanike (38%). Učestalost pojedinih tipova proteznog stomatitisa (Newton tip I i Newton tip II) se značajno ne razlikuje između ispitivanih grupa. U odnosu na ispitivane faktore rizika, statistički značajna razlika između ispitanika sa DM tip 2 i zdravih ispitanika postoji za stabilnost proteze koja je bila značajno manja kod ispitanika sa DM tip 2, ali ne i za higijenu proteze (tabela 11).

Tabela 11. Učestalost i faktori rizika za pojavu proteznog stomatitisa kod zdravih i ispitanika sa DM tip 2, nosilaca ITZP

Parametri	Zdravi	DM tip 2
N	42	36
<b>Učestalost proteznog stomatitisa</b>		
Protezni stomatitis:		
da/ne	16/26	22/14*
Newton tip I:		
da/ne	11/31	14/22
Newton tip II:		
da/ne	5/37	8/28
<b>Faktori rizika za pojavu proteznog stomatitisa</b>		
Higijena proteze:		
loše/dobro	8/34	11/25
Stabilnost proteze:		
loše/dobro	11/31	19/17*

\* $P < 0.05$ , poredjenje zdravi vs DM tip 2 (Chi-squared test)

Logistička regresiona analiza je pokazala da je rizik za pojavu stomatitisa bio 3.82 puta veći kod nosilaca ITZP koji su imali lošu stabilnost proteza u odnosu na ispitanike čija je stabilnost proteza bila visoka ( $P < 0,05$ , OR 3,82, CI 1,43-10,17). Prisustvo DM tip 2 je povećalo rizik za pojavu stomatitisa 2.55 puta ( $P < 0,05$ , OR 2,55, CI 1,02-6,37). Sa druge strane, udruživanjem, pomenuti faktori, nisu povećali predilekciju nosilaca ITZP ka pojavi stomatitisa (tabela 12).

Tabela 12. Faktori rizika kao prediktori pojave proteznog stomatitisa kod nosilaca ITZP

Parametri	Kategorija	OR (95%CI)	AOR (95%CL)
Ispitanici	Zdravi	1	
	DM tip 2	2.55 (1.02-6.37)*	2.04 (0.78-5,34)
Stabilnost	Dobra	1	
	Loša	3.82 (1.43-10,17)*	3.31 (1.21-9,02)

\*  $P < 0.05$ , poredjenje na nivou pacijenti i stabilnost (Chi-squared test)

#### 5.1.4.2 Protezni stomatitis i VEGF u pljuvački

Koncentracija VEGF u pljuvački pre predaje ITZP (tokom nošenja PPZP), je bila značajno veća kod ispitanika sa DM tip 2 u odnosu na zdrave ispitanike ( $557,6 \pm 94,7$  pg/ml vs  $103,5 \pm 21,6$  pg/ml; podaci nisu prikazani). Rezultati VEGF u pljuvački kod zdravih ispitanika i ispitanika sa DM tip 2 sa znacima proteznog stomatitisa su pokazali značajno više koncentracije VEGF kod ispitanika sa DM tip 2 u odnosu na zdrave ispitanike, nezavisno od vremena sakupljanja uzoraka i tipa proteznog stomatitisa (tabela 13). Nasuprot ispitanicima sa Newton tip I, gde su utvrđene snižene

koncentracije VEGF, ispitanici sa Newton tip II proteznim stomatitisom su imali više koncentracije VEGF u pljuvački u odnosu na vrednosti pre predaje proteze, nezavisno od prisustva DM tip 2 (tabela 13).

Tabela 13. Koncentracija VEGF u pljuvački kod zdravih ispitanika i ispitanika sa DM tip 2 pre nošenja ITZP i nakon pojave proteznog stomatitisa Newton tip I i Newton tip II posle godinu dana posle nošenja ITZP

Observacioni period	Koncentracija VEGF (pg/ml) X ± SD	
	Zdravi (42)	DM tip 2 (36)
<b>Newton tip I</b>		
Pre predaje proteze	97.1 ± 8.9 (11/42)	541.7 ± 73.5 *** (14/36)
Godinu dana nošenja proteze	73.2 ± 10.0 §§ (11/42)	460.9 ± 55.4§*** (14/36)
<b>Newton tip II</b>		
Pre predaje proteze	107.0 ± 13.7 (5/42)	581.5 ± 59.1 *** (8/36)
Godinu dana nošenja proteze	306.5 ± 22.6 §§ (5/42)	1445.2 ± 422.1 §§ ** (8/36)

§ P<0.01, §§ P<0.001 poredjenje unutar grupe, pre nošenja proteze vs nakon godinu dana nošenja proteze (T-test), \*\*\* P<0.001, poredjenje zdravi pacijenti vs DM tip 2 (T-test)

## **5.2 ISPITIVANJE NA LABORATORIJSKIM ŽIVOTINJAMA**

### **5.2.1 Karakteristike zdravih pacova i pacova sa eksperimentalno izazvanim DM**

Dobijeni rezultati prikazuju vrednosti glikemije i telesne mase laboratorijskih životinja, pacova pre eksperimentalnih postupaka, posle 7 dana trajanja eksperimenta, i na kraju eksperimenta, odnosno tri dana nakon postavljanja eksperimentalne palatinalne ploče.

Početne vrednosti glikemije u grupi zdravih pacova i grupi pacova sa indukovanim DM se nisu značajno razlikovale. Sedmog dana nakon aplikacije alloxana i trećeg dana posle postavljanja eksperimentalne ploče, glikemija pacova sa DM je bila značajno veća (3.3 puta,) u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Početne vrednosti telesne mase zdravih i pacova sa indukovanim DM se nisu značajno razlikovale. Sedmi dan, telesna masa pacova iz kontrolne grupe je uvećana za 18% u odnosu na početak eksperimenta. S druge strane, u ovoj grupi je tri dana posle postavljanja eksperimentalne ploče uočen pad telesne mase od 6,6% u odnosu na dan kada je postavljena ploča. Pad telesne mase u grupi pacova sa eksperimentalno izazvanim DM je uočen 7. dana nakon aplikacije alloxana i iznosio je 10%. Posle tri dana nošenja eksperimentalne ploče, telesna masa je dodatno smanjena za 9,9%, pa je u odnosu na početak eksperimenta ukupno sniženje telesne mase iznosilo oko 20%. Vrednosti telesne mase 7. i poslednjeg dana eksperimenta značajno su se razlikovale izmedju zdravih pacova i pacova sa eksperimentalno izazvanim DM.

Tabela 14. Glikemija i telesna masa kod zdravih pacova i pacova sa eksperimentalno izazvanim DM

Eksperimentalne životinje (pacovi)	Glikemija (mmol/l)	Telesna masa (g)
<b>Indukovani DM</b>		
Početne vrednosti	6,4±1.5	245.0±5.0
7. dan eksperimenta	21.5±3.4*	220.0±8.2*
10. dan eksperimenta	21.4±2.2*	200.0±6.1*
<b>Zdrave</b>		
Početne vrednosti	6.5±1.8	245.0±4.96
7 dan eksperimenta	6.5±1.4	300.0±8.2
10. dan eksperimenta	6.3±1.5	280.0±10.0

\* P<0.01 poredjenje zdravi vs DM (ANOVA, Bonferroni post hoc test)

### 5.2.2 VEGF u palatinalnoj sluznici pacova

Tabela broj 15 prikazuje koncentracije VEGF ispod kompresivne i akompresivne palatinalne ploče u intaktnoj palatinalnoj sluznici kod zdravih pacova i pacova sa DM. Koncentracija VEGF kod obe grupe ispitivanih životinja je bila značajno uvećana ispod eksperimentalne palatinalne ploče u



odnosu na vrednosti pre postavljanja palatinalne ploče, nezavisno od vrste kompresije. Promena kompresije nije značajno uticala na VEGF, kako kod zdravih tako i kod pacova sa DM. Koncentracije VEGF su bile značajno niže kod pacova sa DM u odnosu na zdrave, kako u prisustvu akompresivne palatinalne ploče (za 28%), tako i pod kompresivnom palatinalnom pločom (za 33%), za razliku od koncentracije VEGF koja se nije razlikovala izmedju ispitivanih grupa pre postavljanja palatinalne ploče (tabela 15).

Tabela broj 15: Koncentracija VEGF u intaktnoj palatinalnoj sluznici ispod eksperimentalne palatinalne ploče kod zdravih pacova i pacova sa eksperimentalno izazvanim DM

		Koncentracije VEGF (pg/ml)		
		X±SD		
		Palatinalna ploča		
Pacovi	N	Bez ploče	Akompresija	Kompresija
Zdravi	20	2,6±0,1	8,41 ± 0,45*	9,56 ± 0,8*
DM	20	2,8±0,2	6,0 ± 0,42* <sup>§</sup>	6,34 ± 0,37* <sup>§</sup>

\*P<0,01 poredjenje bez ploče vs sa pločom; <sup>§</sup> P<0,01 poredjenje zdravi vs DM (ANOVA, Bonferroni post hoc test)

Koncentracija VEGF u palatinalnoj sluznici pacova ispod kompresivne eksperimentalne ploče postavljene preko hirurške rane je bila značajno veća u odnosu na VEGF iz intaktne sluznice bez ploče, kako kod zdravih, tako i kod pacova sa eksperimentalno izazvanim DM. Prisustvo akompresivne palatinalne ploče u istim uslovima nije dovelo do značajnih promena VEGF u odnosu na koncentracije VEGF iz intaktne sluznice bez ploče, ni u jednoj od ispitivanih grupa. Značajan porast koncentracije VEGF vezan za povećanje kompresije je uočen kod zdravih pacova, dok pacovi sa DM nisu pokazivali značajne promene VEGF sa promenama vrste palatinalne ploče preko hirurške rane. Koncentracija VEGF je bila značajno manja kod pacova sa DM u odnosu na kontrolnu grupu u prisustvu kompresivne eksperimentalne ploče postavljene preko hirurške rane. Prisustvo akompresivne eksperimentalne ploče postavljene preko hirurške rane nije dovelo do značajne razlike u koncentraciji VEGF između ispitivanih grupa (tabela 16).

Tabela broj 16: Koncentracija VEGF u palatinalnoj sluznici ispod eksperimentalne palatinalne ploče postavljene preko hirurške rane kod zdravih pacova i pacova sa eksperimentalno izazvanim DM.

		Koncentracije VEGF (pg/ml) X±SD		
		Bez ploče	Palatinalna ploča	
Pacovi	N		Akompresija	Kompresija
Zdravi	20	2,6±0,1	4,2 ± 0,3	11,03 ± 1,08 <sup>α***</sup>
DM	20	2,8±0,2	5,76 ± 0,33	6,7 ± 0,33 <sup>α§</sup>

<sup>α</sup> P<0.01 poredjenje unutar grupe bez ploče vs kompresija<sup>\*\*\*</sup>P<0.001 poredjenje unutar grupe kompresija vs akompresija, <sup>§</sup> P<0.001 poredjenje zdravi vs DM (ANOVA, Bonferroni post hoc test)

Tabela 17 prikazuje koncentracije VEGF iz palatinalne intaktne sluznice i sluznice sa hirurškom ranom preko koje je postavljena akompresivna eksperimentalne ploča, kod zdravih pacova i pacova sa eksperimentalno izazvanim DM. Koncentracije VEGF u palatinalnoj sluznici zdravih pacova su bile značajno manje u prisustvu hirurške rane u odnosu na koncentracije VEGF iz intaktne sluznice ispod akompresivne palatinalne ploče. U grupi pacova sa eksperimentalno izazvanim DM nisu uočene značajne promene VEGF u odnosu na prisustvo hirurške rane. Značajno manja koncentracija koncentracija VEGF zabeležena je kod pacova sa DM u odnosu na grupu zdravih pacova u uslovima bez hirurške rane, dok u prisustvu hirurške rane nije uočena značajna razlika u vrednostima ovog faktora rasta izmedju ispitivanih grupa (tabela 17).

Tabela broj 17: Koncentracija VEGF u palatinalnoj sluznici ispod akompresivne eksperimentalne ploče sa i bez hirurške rane kod zdravih pacova i pacova sa eksperimentalno izazvanim DM.

Pacovi	N	Koncentracije VEGF (pg/ml) X±SD	
		sa hiruškom ranom	bez hirurške rane
Zdravi	20	4,2 ± 0,3	8,41 ± 0,45***
DM	20	5,76 ± 0,33	6,0 ± 0,42 <sup>§</sup>

\*\*\*P<0.001 poredjenje unutar grupe, <sup>§</sup> P<0.001 poredjenje zdravi vs DM (ANOVA, Bonferroni post hoc test)

Koncentracija VEGF u palatinalnoj sluznici ispod kompresivne eksperimentalne ploče nije bila značajno povećana u prisustvu hirurške rane u odnosu na vrednosti VEGF iz intaktne sluznice pod kopresijom, niti kod zdravih, ni u grupi pacova sa eksperimentalno izazvanim DM. Značajno manja koncentracija VEGF u palatinalnoj sluznici ispod kompresivne nepčane ploče je izmerena kod pacova sa DM u odnosu na zdrave pacove, kako u prisustvu hirurške rane, tako i u uslovima intaktne palatinalne sluznice (tabela 18).

Tabela broj 18: Koncentracija VEGF u palatinalnoj sluznici ispod kompresivne eksperimentalne ploče sa i bez hirurške rane kod zdravih pacova i i pacova sa eksperimentalno izazvanim DM.

Pacovi	N	Koncentracije VEGF (pg/ml) X±SD	
		sa hiruškom ranom	bez hirurške rane
Zdravi	20	11,03 ± 1,08	9,56 ± 0,8
DM	20	6,7 ± 0,33 <sup>§</sup>	6,34 ± 0,37 <sup>§</sup>

<sup>§</sup> P<0.01, poredjenje zdravi vs DM (ANOVA, Bonferroni post hoc test)

## **6. DISKUSIJA**

Zarastanje rana predstavlja integrativni kompleks ćelijskih i molekularnih procesa koji se odvijaju u sledećim fazama: hemostaza, inflamacija, stvaranje granulacionog tkiva i reepitelizacija (128). Inflatornu fazu zarastanja odlikuje hemotaksa neutrofila, makrofaga i limfocita koji oslobadjaju više od 30 proangiogenih faktora rasta značajnih za zarastanje rane, medju kojima je jedan od najvažnijih VEGF (23). Lokalna hipoksija izazvana prekidom cirkulacije usled povrede predstavlja osnovni stimulus za stvaranje ovog faktora rasta. Najznačajnija uloga VEGF je regulacija angiogeneze i rasta granulacionog tkiva u rani, čime se obezbeđuju oksigenacija i ishrana oštećenih tkiva uz taloženje fibrinske mreže neophodne za zarastanje rane (20). U toku zarastanja rane, gustina kapilara dostiže dva puta veći nivo od onog u normalnom neoštećenom tkivu (123). VEGF ne potiče samo iz endotelnih ćelija i ćelija krvi (autokrini aspekt), već i iz keratinocita koji proliferišu iz novoformiranog epitela u toku zarastanja rane (parakrini aspekt) (19).

Klinička zapažanja ukazuju da rane na oralnoj sluznici zarastaju brže nego na koži. Iako su istraživanja o mehanizmu ove razlike malobrojna, studija Szpaderska i sar. (50) ukazuje na činjenicu da su procesi angiogeneze i neovaskularizacije značajno manji u ranama oralne sluznice nego kože, kao i da je umerena angiogeneza praćena manjom potrebom nutrienata za ishranu tkiva. U normalnoj koži, ekspresija VEGF je mala, dok se njegova ekspresija značajno povećava u keratinocitima u toku zarastanja rane (19, 82). Szpaderska i sar. (50) su pokazali da je produkcija VEGF u ranama oralne sluznice značajno manja nego u koži tokom celog procesa zarastanja rane. Ekspresija VEGF u keratinocitima u ranama oralne sluznice je povećana 2 puta, dok se u epidermalnim ćelijama povećava 3 do 4 puta (50). Na osnovu svih ovih nalaza, Szpaderska i sar (50) zaključuju da brže zarastanje oralnih rana u odnosu na rane na koži nastaje zbog nižeg nivoa VEGF i smanjene angiogeneze, ali i sa druge strane zbog prisustva VEGF u okolini rane poreklom iz pljuvačke.

Veliki broj kliničkih i eksperimentalnih studija je pokazao da je zarastanje rana na koži tokom DM usporeno. Ove studije pokazuju da dugotrajna hipoksija u DM, koja se javlja zbog nedovoljne perfuzije i neadekvatne angiogeneze je jedan od glavnih faktora koji produžava inflamatornu fazu zarastanja povećavajući novo kiseoničnih radikala (130, 131). Hiperglikemija takodje doprinosi povećanju kiseoničnih radikala i oksidativnom stresu (132). Usporenom zarastanju rana u DM doprinosi i više poremećenih ćelijskih funkcija i neefikasan imunitet izazvan T-ćelijama, poremećena hemotaksa leukocita, fagocitoza i disfunkcija fibroblasta i epidermalnih ćelija (133-135). Na kraju, koncentracija VEGF kao najznačajnijeg proangiogenog faktora je snižena u ranama tokom DM (136,137).

Za sada ima malo podataka o zarastanju rana na oralnoj sluznici u toku DM tip 2. Naši rezultati po prvi put pokazuju odnos VEGF u pljuvački i oralnoj sluznici u toku zarastanja postekstrakcione rane ispod ITZP.

Dobijeni rezultati pokazuju da se ispitanici sa DM tip 2 razlikuju od zdravih ispitanika po tome što imaju statistički značajno izraženije promene kliničkih parametara u zarastanju rane: u 3. danu su to hiperemija, nekroza i ulceracije, u 7. danu hiperemija, u 14. danu nekroza i ulceracije i u 21. danu nekroza. Manji kvalitet zarastanja postekstrakcione rane, češće ulceracije i nekroze kod DM tip 2 ispitanika, najverovatnije su posledica hipoksičnih uslova u rani, kako je to pokazano za rane na koži pacijenata sa DM tip 2 (139). Imajući u vidu i činjenicu da se rane koje smo pratili nalaze ispod ITZP, koja svojim pritiskom takodje doprinosi hipoksiji, to se i ovaj faktor mora uzeti u obzir za snižen kvalitet zarastanja postekstrakcione rane. Imajući u vidu da je hiperemija na mestu zarastanja rane najizrazitija u 3. danu od ekstrakcije zuba, inflamatorna faza zarastanja, i to više kod ispitanika



sa DM tip 2 nego kod zdravih ispitanika, može se smatrati da je to posledica produžene zapaljenske faze u zarastanju rane u toku DM tip 2, kako su to pokazali Mathieu i sar. (130) i Woo i sar. (131).

Imajući u vidu intenzitet bola u toku zarastanja postekstrakcione rane, naši rezultati pokazuju značajno veću bolnu osetljivost kako po VAS, tako i po VRS skali 3., 7. i 21. postekstrakcionog dana kod ispitanika sa DM tip 2 u odnosu na zdrave ispitanike. Poznato je da je neuropatija, jedna od najčešćih komplikacija DM tip 2 praćena pojavom bola (95). Zapaženi veći postekstrakcioni bol kod pacijenata sa DM tip 2, najverovatnije je u vezi sa postojećom neuropatijom kod naših ispitanika. Naime, Collin i sar. (95) u svojoj kliničkoj studiji u kojoj su pratili oralne simptome i znake DM tip 2 su pokazali da je postojanje neuropatije razlog za gubitak zuba i temporomandibularnu disfunkciju kod starih pacijenata. Pošto naša populacija ispitanika sa DM tip 2 je pre ispitivanja imala samo po 3 zuba u gornjoj vilici, može se smatrati da su imali i dijabetičnu neuropatiju.

Analiza ukupnog vremena epitelizacije postekstrakcione rane ispod ITZP je pokazala značajno sporije zarastanje kod DM tip 2 u odnosu na zdrave ispitanike. Poznato je da je u uslovima DM tip 2 produžena faza reepitelizacije kako je to pokazano kliničkom studijom Aronovich i sar. (112). Ovo je najverovatnije u vezi sa smanjenom proliferacijom fibroblasta i epitelnih ćelija, kao i povećanom apoptozom fibroblasta, kako su to pokazali Desta i sar. (110), na animalnom modelu DM tip 1 i DM tip 2 kod miševa u toku zarastanja gingivalne rane. Značajan doprinos ovoj, krajnjoj fazi zarastanja rane ima i veličina angiogeneze kvantifikovana kroz koncentraciju VEGF, kao stadijum koji prethodi fazi reepitelizacije (136).

Naši rezultati na animalnom modelu pacova pokazuju da nivo VEGF u rani raste u odnosu na nivo VEGF iz gingive pre hirurške incizije kako kod zdravih, tako i kod pacova sa DM. Značajan nalaz je

da je ovaj porast VEGF statistički značajno manji u tkivu pacova sa DM u odnosu na zdrave životinje. Ove snižene koncentracije VEGF u tkivu rane su direktan dokaz za smanjenu angiogenezu i u vezi sa tim, usporenu fazu reepitelizacije. Ovaj dokaz smo dobili iz istraživanja na animalnom modelu, obzirom da nismo mogli da uzmemo tkivo postekstrakcione rane kod ljudi za analizu VEGF zbog etičkih principa. Od posebnog značaja je naš nalaz da salivarna koncentracija VEGF ima veći porast kod ispitanika sa DM tip 2 nego kod zdravih ispitanika, pri poredjenju salivarne koncentracije VEGF pre ekstrakcije zuba i 3. dan posle ekstrakcije zuba. Ovo je takodje direktan dokaz da pljuvačne žlezde stvaraju VEGF i na taj način doprinose zaštitnoj ulozi pljuvačke u održanju oralne homeostaze, što je posebno izraženo u patološkim uslovima, kao što je zarastanje rana kod pacijenata sa DM tip 2.

Protezni stomatitis je klinička dijagnoza zapaljenskih lezija koje se manifestuju eritemom i edemom oralne sluznice ispod mobilnih nadoknada. Faktori rizika za nastanak proteznog stomatitisa su nošenje totalne (nasuprot parcijalnoj) proteze (140), nošenje gornje (nasuprot donjoj) proteze (141), neadekvatna higijena proteza (142,143), noćno nošenje proteze (144), loš kvalitet proteze (141), DM (146,147), antibiotska terapija (148), hipofunkcija pljuvačnih žlezda (149), kserogeni lekovi (150). U populacionim istraživanjima sa nasumično odabranim ispitanicima sa mobilnim nadoknadama, srednja prevalenca pojave proteznog stomatitisa iznosi 50% (151).

Naši rezultati su pokazali prisustvo proteznog stomatitisa kod 49% ispitanika nakon godinu dana nošenja ITZP. Poredjenje prevalencije ove pojave između kontrolnih i DM tip 2 ispitanika je pokazalo značajno veću učestalost proteznog stomatitisa kod DM tip 2 ispitanika (61%) u odnosu na zdrave (38%). Dostupna literatura je pokazala kontradiktorne rezultate komparativnih studija vezanih učestalost ove pojave kod zdravih i DM tip 2 nosilaca totalnih proteza. Naime,

Guggenheimer i sar. (93) i Collin i sar. (95) su utvrdili veću učestalost proteznog stomatitisa kod DM tip 2 pacijenata, za razliku od nalaza De Lima i sar. (100) čiji rezultati nisu pokazali razliku između istih ispitivanih grupa.

Osnovni značaj imedijatne proteze kod DM pacijenata je to što omogućava mastikatornu funkciju neposredno nakon ekstrakcija zuba, čime se obezbeđuje adekvatna ishrana ovih pacijenata neophodna za održavanje glikemije. Sa druge strane, nedostatak ove proteze je smanjenje retencije i stabilnosti usled resorpcije kostnog tkiva, što se obično koriguje podlaganjem proteza. Naši rezultati su pokazali značajno nižu stabilnost proteza kod DM tip 2 ispitanika u odnosu na zdrave ispitanike, nakon godinu dana nošenja podloženih ITZP. Obzirom da je poznat značaj pljuvačke za retenciju i stabilizaciju totalnih proteza, može se pretpostaviti da je kserostomija, češće prisutna kod DM tip 2 pacijenata, značajan faktor smanjene stabilnosti (95). Naime, Collin i sar. (95) su pokazali povećanu učestalost subjektivne kserostomije kod pacijenata sa DM tip 2 u odnosu na zdrave pacijente iste starosti, uzrokovanu autonomnom neuropatijom koja utiče na rad pljuvačnih žlezda. Osim uticaja na proteznu stabilnost, hiposalivacija doprinosi i povećanoj atriciji između mekih potpornih tkiva i proteze koja je praćena uvećanom ekfolijacijom ćelija sluznice, kao i mukoznim ulceracijama. Imajući u vidu pomenute činjenice, može se pretpostaviti da je povećana učestalost proteznog stomatitisa kod ispitanika sa DM tip 2 vezana za izmenjenu proteznu stabilnost i atriciju, nastale kao posledica hiposalivacije tokom dijabetesa.

Naši rezultati su pokazali da su pojedinačno, i DM tip 2 i nestabilnost proteze, faktori rizika za pojavu proteznog stomatitisa kod nosilaca ITZP. Međutim, binarna logistička regresiona analiza je ukazala da ne postoji statistički značajna interakcija između ova dva faktora. U vezi sa tim, neophodno je i napomenuti limitiranost ovog istraživanja, odnosno, da je ispitivani broj pacijenata

bio relativno mali. Za bolje utvrđivanje prediktora nastanka proteznog stomatitisa, veći broj kliničkih faktora bi trebalo uključiti u analizu.

Naši rezultati su pokazali da su koncentracije salivarnog VEGF koje su bile značajno veće kod ispitanika sa DM tip 2 u odnosu na zdrave, pre predaje ITZP, bile značajno izmenjene u prisustvu proteznog stomatitisa. Takođe, uočene promene salivarnog VEGF koje su pratile različite tipove proteznog stomatitisa su bile jače izražene kod DM tip 2 ispitanika, u odnosu na zdrave nosioce ITZP. Poredjenje koncentracija VEGF kod ispitanika sa Newton tip I i Newton tip II proteznim stomatitisom je pokazalo značajno snižen nivo VEGF kod Newton tip I i značajno povišene vrednosti ovog faktora kod Newton tip II u odnosu na vrednosti pre predaje ITZP. Imajući u vidu da je osnovna odlika Newton tip I lokalizovana, neznatna inflamacija oralne sluznice, snižene koncentracije salivarnog VEGF u odnosu na početne vrednosti su najverovatnije posledica ekstrakcije paradontopatičnih zuba kao preprotetske pripreme koja je omogućila eliminaciju parodontalne inflamacije koju karakterišu visoke koncentracije ovog faktora rasta (42-45). Obzirom da se Newton tip II odlikuje jačim stepenom inflamacije oralne sluznice u odnosu na Newton tip I, i mada u ovoj studiji nisu merene vrednosti tkivnog VEGF, može se pretpostaviti da su inflamatorne ćelije oralnih lezija oslobadjajući VEGF, doprinele povišenim koncentracijama salivarnog VEGF u Newton tip II stomatitisu. Naime, studije su pokazale da su izvori salivarnog VEGF osim pljuvačnih žlezda i ćelije oralnog epitela i gingivalnog tkiva.

Potporna tkiva ispod gornjih TP se sastoje od kostne strukture gornjeg nepca pokrivena mekim tkivom koga čine pločasti skvamozni epitel i vezivno tkivo vezano za alveolarnu kost pomoću periosta. Nošenje gornje TP vezano je za funkcionalni stres koji potencijalno može da prouzrokuje zapaljenje/ulceracije na sluznici i/ili resorpciju alveolarne kosti. Brojne histološke studije u kojima

su ispitivane promene koje nastaju u potpornim tkivima ispod gornjih TP pokazuju sledeće: deformaciju rezidualnog grebena u oštar greben (119,152,153), degeneraciju epitelnih ćelija (147), smanjen broj senzornih ćelija (112), iregularnosti u ćelijskim slojevima (124), kao i promene u broju osteoblasta i osteoklasta zavisno od pritiska proteze (119,154). Atasever i sar. (155) i Akazawa i sar. (120) su pokazali da mehanička kompresija sluznice bazom proteze u *in vivo* uslovima prouzrokuje ishemiju. Merenjem protoka krvi kroz palatinalnu sluznicu gornje TP, Atasever i sar. (155), kroz alveolarnu sluznicu ispod donje TP kod ljudi Akazawa i sar. (120), i ispod palatinalne ploče na modelu pacova Tsouroka i sar. (121) su pokazali smanjenje protoka krvi u sluznici i zaključili da ispod proteze vladaju uslovi hipoksije. Imajući u vidu činjenicu da do sada nema podataka o odnosu akutnog (animalni model) i hroničnog pritiska (ljudski model) i koncentracije VEGF u potpornom tkivu u toku DM tip 2, naši rezultati po prvi put daju uvid u ovaj problem.

Rezultati ove studije pokazuju da je koncentracija VEGF u tkivu ispod palatinalne ploče posle 3 dana nošenja, kod pacova sa i bez DM značajno veća u odnosu na koncentracije VEGF u istom tkivu pre stavljanja palatinalne ploče. Ovo je u saglasnosti sa nalazima Tsouroka i sar. (121), koji su pokazali povećanu ekspresiju VEGF kako u endotelnim ćelijama, tako i u vezivnom tkivu, osteoblastima i periostu gornje vilice posle tri dana nošenja palatinalne ploče kod zdravih pacova. Naši rezultati takodje pokazuju da je ovo povećanje koncentracija VEGF u sluznici palatuma statistički značajno manje kod pacova sa DM nego kod zdravih pacova. Imajući u vidu činjenicu da se protok krvi u sluznici ispod proteze smanjuje (120, 121, 156), a što je praćeno hipoksijom koja je jedan od glavnih faktora za stimulaciju VEGF (121), to je razumljiv porast VEGF koji smo dobili u tkivu ispod palatinalne ploče. Činjenica da je taj porast manji kod životinja sa DM najverovatnije ukazuje na poremećaj ekspresije VEGF u toku DM. Činjenica da nema razlike u koncentraciji VEGF

u gingivi ispod palatinalne ploče sa kompresijom i bez kompresije kako kod zdravih, tako i kod pacova sa DM, ukazuje da akutni pritisak od 3 dana nije u stanju da izazove snažniju ekspresiju VEGF.

Analiza koncentracija VEGF u gingivi ljudi koji su nosili PPP više od 5 godina, pokazuje da je koncentracija VEGF u tkivu ispod proteze bila značajno manja u odnosu na tkivo koje nije bilo pokriveno protezom. Naši rezultati takodje pokazuju da je ovo smanjenje koncentracije VEGF u tkivu ispod proteze značajno veće kod ispitanika sa DM tip 2 u odnosu na zdrave ispitanike. Sniženje koncentracije VEGF u gingivi u toku nošenja PPP više od 5 godina- model hroničnog pritiska, najverovatnije ukazuje na prilagodjavanje oralne sluznice na mehanički stres uzrokovan protezom da bi se održala homeostaza. Naši rezultati ukazuju da je u toku DM tip 2 ova homeostaza poremećena, jer je koncentracija VEGF u gingivi manja nego kod zdravih ispitanika.

## **7. ZAKLJUČCI**

1. Koncentracija VEGF u gingivi ispod parcijalne proteze nošene više od 5 godina je značajno manja u odnosu na VEGF iz tkiva koje nije pokriveno protezom, kod zdravih ispitanika i kod ispitanika sa DM tip 2. Smanjenje koncentracije VEGF u tkivu ispod proteze je značajno veće kod ispitanika sa DM tip 2 u odnosu na zdrave ispitanike.

2.1. Na animalnom modelu pacova, prisustvo palatinalne ploče, nezavisno od toga da li je kompresivna ili akompresivna značajno povećava koncentraciju VEGF u tkivu, posle tri dana nošenja, u odnosu na koncentracije VEGF u istom tkivu pre postavljanja palatinalne ploče, u kontrolnoj grupi zdravih pacova i kod pacova sa eksperimentalno izazvanim DM.

2.2. Na animalnom modelu pacova, period od 3 dana ne izaziva snažniju ekspresiju tkivnog VEGF pri povećanju kompresivnog dejstva palatinalne eksperimentalne ploče, ni kod zdravih niti kod pacova sa eksperimentalno izazvanim DM.

2.3. Na animalnom modelu pacova, eksperimentalno izazvani DM ne utiče na koncentraciju VEGF u palatinalnoj sluznici bez eksperimentalne ploče, ali statistički značajno smanjuje porast VEGF u tkivu ispod kompresivne, kao i akompresivne palatinalne ploče.

3.1. Koncentracija VEGF u pljuvački je značajno veća kod ispitanika sa DM tip 2 u odnosu na zdrave ispitanike, kako pre ekstrakcije zuba, tako i trećeg dana posle ekstrakcije zuba. Koncentracija VEGF je značajno veća i kod zdravih ispitanika i kod ispitanika sa DM tip 2, nosilaca ITZP, trećeg dana posle ekstrakcije zuba u odnosu na koncentracije VEGF pre ekstrakcija zuba. Kod ispitanika sa DM tip 2 povećanje koncentracije VEGF u pljuvački trećeg dana posle ekstrakcije zuba u odnosu na koncentracije VEGF pre ekstrakcija zuba je veće u odnosu na zdrave ispitanike.



3.2. Ispitanici sa DM tip 2 imaju statistički značajno izraženije promene kliničkih parametara zarastanja rane u odnosu na zdrave ispitanike, nosioce ITZP i to: trećeg dana zarastanja hiperemija, nekroza i ulceracije; 7. dana hiperemija; 14. dana nekroza i ulceracije i 21. dana nekroza gingive.

3.3. Ispitanici sa DM tip 2 pokazuju značajno veću bolnu osetljivost izmerenu VAS i VRS skalom 3., 7. i 21. postekstrakcionog dana u odnosu na zdrave ispitanike.

3.4. Ispitanici sa DM tip 2 imaju značajno duže vreme epitelizacije postekstrakcione rane ispod ITZP u odnosu na zdrave ispitanike.

4. Koncentracija VEGF u eksperimentalnoj rani ispod palatinalne ploče raste u odnosu na VEGF iz palatinalne sluznice pre hirurške incizije i postavljanja palatinalne ploče, kako kod zdravih, tako i kod pacova sa DM, pri čemu je porast VEGF ispod kompresivne ploče statistički značajno manji u tkivu pacova sa DM u odnosu na grupu zdravih životinja.

5.1. Koncentracije VEGF se značajno smanjuju pri pojavi Newton tip I proteznog stomatitisa, a značajno rastu pri pojavi Newton tip II proteznog stomatitisa posle godinu dana nošenja ITZP, u odnosu na vrednosti pre predaje ITZP, kako kod zdravih ispitanika, tako i kod ispitanika sa DM tip 2, pri čemu su ove promene značajno izraženije kod ispitanika sa DM tip 2, u odnosu na zdrave ispitanike.

5.2. DM tip 2 i nestabilnost proteze, pojedinačno, ali bez značajne interakcije predstavljaju faktore rizika za pojavu proteznog stomatitisa kod nosilaca ITZP.

## **8. LITERATURA**

1. Ferrara N, Gerber H, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669-76, 2003.
2. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews* 2004;25:581-611.
3. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996;93:1493-95.
4. Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*. 2009;21:154-65.
5. Ferrara N, Alitalo G. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 1999;5:1359-64.
6. Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD. Angiogenesis-a new target for future therapy. *Vascular Pharmacology* 2006;44:265-74.
7. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9-22.
8. Mäkinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC, et al. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J* 2001;3:4762-73.
9. Conn G, Bayne ML, Soderman DD, Kwok PW, Sullivan KA, Pelisi TM. Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2628-32.

10. Plouet J, Schilling J, Gospodarowich D. Isolation and characterization of newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT20 cells, *EMBO J* 1989;8:3801-08.
11. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995;1024-28.
12. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 1999;103:159-65.
13. Gerber HP, Mc Murtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. VEGF regulates endothelial cell survival by the PI3kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998;273:30336-43.
14. Akhavan, MA, Larsen H, Paleolog E: Circulating endothelial progenitor cells as a link between synovial vascularity and cardiovascular mortality in rheumatoid arthritis, *Scand. J. Rheumatol* 2007;36:83-90.
15. Bates DO, Harper SJ. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors, *Vasc.Pharmacol* 2002;39:225-37.
16. Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, Mc Donagh J, Dvorak AM. Fibrin containing gel induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 1987;57:673-86.

17. Shibuya, Claesson: Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymph angiogenesis. *Exp Cell Res* 2006;312:549-60.
18. Lee S, Chen TT, Barber CL, Jordan MC, Murdock J, Desai S, et al. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* 2007;130:691-703.
19. Brown LF, KT Yeo, B Berse, TK Yeo, D Senger, H Dvorak, L, et al. Angiogenesis induction and regression in human surgical wounds. *Wound Repair Regen* 2002;10:245-51.
20. Kumar I, Staton CA, Cross SS, Reed MWR, Brown NJ: Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and its receptors in human surgical wounds. *British J Surg* 2009; 96:1484-91.
21. Frank S, Hübner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 1995;270:12607-13.
22. Di Vita G, Patti R, D'Agostino P, Caruso G, Arcara M, Buscemi S, Bonventre S, Ferlazzo et al. Cytokines and growth factors in wound drainage fluid from patients undergoing incisional hernia repair. *Wound Repair Regen* 2006;14:259-64.
23. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 1998;152:1445-52.
24. Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P. FLT1 and its legends VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer* 2008;8:942-56.

25. Mould AW, Tonks ID, Cahill MM, Pettit AR, Thomas R, Hayward NK, Kay GF. VEGFB gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen-induced and collagen-induced models of arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2660-69.
26. Creamer D, Sullivan D, Bicknell R, Barker J. Angiogenesis in psoriasis. *Angiogenesis* 2002;5:231-6.
27. Bonnet CS, Walsh DA. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:7-16.
28. Szekanecz Z, Gaspar L, Koch AE. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Front Biosci* 2005;10:1739-53.
29. Kirk S, Frank JA, Karlik S. Angiogenesis in multiple sclerosis: is it good, bad or an epiphenomenon? *J Neurol Sci* 2004;217:125-30.
30. Birk DM, Barbato J, Mureebe L, Chaer RA. Current insights on the Biology and clinical aspects of VEGF regulation. *Vasc and Endovasc Surg* 2009;42:124-30.
31. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. VEGF induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 356:8433-35.
32. Kaushansky K, Kirito K. Thrombopoietin stimulates VEGF production in hematopoietic stem cells. *Cell cycle* 2005;3:1729-37.
33. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of VEGF expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* 1994;71:347-79.

34. Brooks SE, Gu X, Kaufmann PM, Marcus DM, Caldwell RB. Modulation of VEGF production by pH and glucose in retinal Müller cells. *Curr Eye Res* 1998;17:875-82.
35. D'Arcangelo D, Facchiano F, Barlucchi LM, Melillo G, Illi B, Testolin L, et al. Acidosis inhibits endothelial cell apoptosis and function and induces basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression. *Circ Res* 2000;18:312-8.
36. Shin HY, Bizios R, Gerritsen ME. Regulation of endothelial cell proliferation and apoptosis by cyclic pressure. *Ann Biomed Eng* 2002;30:297-304
37. Shin HY, Smith ML, Toy KJ, Williams PM, Bizios R, Gerritsen ME. VEGF-C mediates cyclic pressure-induced endothelial cell proliferation. *Physiol Genomics*. 2002;11:245-5
38. Vouyouka AG, Powell RJ, Ricotta J, Chen H, Dudrick DJ, Sawmiller CJ. Ambient pulsatile pressure modulates endothelial cell proliferation. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:609-15.
39. Yang R, Amir J, Liu H, Chaqour B. Mechanical strain activates a program of genes functionally involved in paracrine signaling of angiogenesis. *Physiol Genomics* 2008;12:1-14.
40. Cianchi F, Cortesini C, Fantappiè O, Messerini L, Schiavone N, Vannacci A et al: Inducible nitric oxide synthases expression in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 2003;162:793-801.
41. Gallo O, Masini E, Morbidelli L, Franchi A, Fini-Storchi I, Vergari WA, et al. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:587-96.

42. Johnson RB, Serio FG, Dai X. Vascular endothelial growth factors and progression of periodontal diseases. *J Periodontol* 1999;70:848-52.
43. Kubota T, Morozumi T, Shimizu K, Sugita N, Kobayashi T, Yoshie H: Differential gene expression in neutrophils from patients with generalized aggressive periodontitis. *J periodont Res* 2001;36:390-97.
44. Morozumi T, Kubota T, Sugita N, Ohsawa Y, Yamazaki K, Yoshie H. Elevated mRNA expression for supervillin and vascular endothelial growth factor in human neutrophils stimulated with lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 2001;36:160-8.
45. Prapulla DV, Sujatha PB, Pradeep AR. Gingival crevicular fluid VEGF levels in periodontal health and disease. *J Periodontol* 2007;22:31-6.
46. Cetinkaya BO, Keles GC, Ayas B, Sakallioglu EE, Acikgoz G. The expression of vascular endothelial growth factor in a rat model at destruction and healing stages of periodontal disease. *J Periodontol* 2007;78:1129-35.
47. Booth V, Young S, Cruchley A, Taichman NS, Paleolog E. Vascular endothelial growth factor in human periodontal disease. *J Periodontal Res* 1998;33:491-99.
48. Taichman NS, Cruchley AT, Fletcher LM, Hagi-Pavli EP, Paleolog EM, Abrams WR et al. Vascular endothelial growth factor in normal human salivary glands and saliva: a possible role in the maintenance of mucosal homeostasis. *Lab Invest* 1998;78:869-75.



49. Szpaderska AM, Zuckerman JD, DiPietro LA. Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *J Dent Res* 2003;82:621-6.
50. Szpaderska AM, Walsh CG, Steinberg MJ, DiPietro LA. Distinct patterns of angiogenesis in oral and skin wounds. *J Dent Res* 2005;84:309-14.
51. Nakanishi Y, Izumi M, Saito C, Kawano Y, Maeda T. The expression and production of VEGF in oral mucosa equivalents. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007;36:928-33.
52. Orsini G, Murmura G, Artese L, Piattelli A, Piccirilli M, Caputi S. Tissue healing under provisional restorations with ovate pontis. *J Prosthodont* 2006;96:252-57.
53. Cornelini R, Artese L, Rubini C, Fioroni M, Ferrero G, Santinelli A et al. Vascular endothelial growth factor and microvessel density around healthy and failing dental implants. *Int Oral Maxillofac implants* 2001;16:389-93.
54. Tao X, Huang Y, Li R, Qing R, Ma L, Rhodus N, Cheng B. Assessment of local angiogenesis and vascular endothelial growth factor in the patients with atrophic-erosive and reticular oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:661-9.
55. Brozovic S, Vucicevic-Boras V, Mravak-Stipetic M, Jukic S, Kleinheinz J, Lukac J. salivary levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 2002;3:106-8.
56. Yoshino H, Morita I, Murota S, Ishikawa I. Mechanical stress induces production of angiogenic regulators in cultured human gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodont Res* 2003;38:405-10.

57. Miyagawa A, Chiba M, Hayashi H, Igarashi K. Compressive force induces VEGF production in periodontal Tissues. *J Dent Res*, 2009;88:752-56.
58. Motokawa M, Kaku M, Tohma Y, Kawata T, Fujita T, Kohno S, et al. Effects of cyclic tensile forces on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and macrophage-colony-stimulating factor (M-CSF) in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Dent Res* 2005;84:422-7.
59. Mattuella LG, Poli de Figueiredo JA, Nor J, Borba de Araujo. Vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in the pulp of human primary and young permanent. *J Endod* 2007;33:1408-12.
60. Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol* 2000;45:1013-6.
61. Artese L, Rubini C, Ferrero G, Fioroni M, Santinelli A, Piattelli A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in healthy and inflamed human dental pulps. *J Endod* 2002;28:20-3.
62. Leonardi R, Caltabiano M, Pagano M, Pezzuto V, Loreto C, Palestro G. Detection of vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor in periapical lesions. *J Endod* 2003;29:180-3.
63. Nör JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol* 1999;154:375-84.

64. Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, et al. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1995;270:308-12.
65. Vernillo AT. Diabetes mellitus: Relevance to central treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:263-70.
66. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *U: Diabetes Care*. 2004;p.S5-S10.
67. Stehouwer CD, Lambert J, Donker AJ, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovasc Res* 1997;34:55-68.
68. Adler S. Structure-function relationships associated with extracellular matrix alterations in diabetic glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol*. 1994;5:1165-72.
69. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-20.
70. Miley D, Terezhalmay G. The patient with diabetes mellitus: Etiology, epidemiology, principles of medical management, oral disease burden, and principles of dental management. *Quintessence International* 2005;36:779-94.
71. Williams S, Goldfine A, Timimi F, Ting H, Roddy M, Simonson D, et al. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilatation in humans in vivo. *Circulation* 1998;97:1695-1701.

72. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders . N Engl J Med 1994;331:1480-87.
73. Simó R, Hernández C. Intravitreal anti-VEGF for diabetic retinopathy: hopes and fears for a new therapeutic strategy. Diabetologia 2008;51:1574-80.
74. Adamis AP, Altaweel M, Bressler NM, Cunningham ET Jr, Davis MD, Goldbaum M, et al: Changes in retinal neovascularization after pegaptanib (Macugen) therapy in diabetic individuals Ophthalmology 2006;113:23-8.
75. Tsai WC, Li YH, Huang YY, Lin CC, Chao TH, Chen JH. Plasma vascular endothelial growth factor as a marker for early vascular damage in hypertension. Clin Sci (Lond) 2005;109:39-43.
76. Lee EY, Chung CH, Kim JH, Joung HJ, Hong SY. Antioxidants ameliorate the expression of vascular endothelial growth factor mediated by protein kinase C in diabetic podocytes. Nephrol Dial Transplant 2006;21:1496-503.
77. Dae RC, Nan HK, Jong WY, Sang KJ, Won YC, Hyung KK, et al. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic nephropathy. Kid Int 2000;58:104-112
78. Duh E, Aiello LP. Vascular endothelial growth factor and diabetes - The agonist versus antagonist paradox. Diabetes 1999;48:1899-06.
79. Wetzler C, Kämpfer H, Stallmeyer B, Pfeilschifter J, Frank S. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged

- persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *J Invest Dermatol* 2000;115:245-53.
80. Krishnan ST, Quattrini C, Jeziorska M, Malik RA, Rayman G. Neurovascular factors in wound healing in the foot skin of type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2007;30:3058-62.
81. Lerman OZ, Galiano RD, Armour M, Levine JP, Gurtner GC. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia *Am J Pathol* 2003;162:303-12.
82. Kusumanto YH, van Weel V, Mulder NH, Smit AJ, van den Dungen JJ, Hooymans JM, et al: Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a double-blind randomized trial. *Hum Gene Ther* 2006;17:683-91.
83. Goova MT, Li J, Kislinger T, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, Nowygrod S, et al. Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. *Am J Pathol* 2001;159:513-25.
84. 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;134:200-5.
85. Howdieshell TR, Callaway D, Webb WL, Gaines MD, Procter CD Jr, Sathyanarayana, et al. Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation. *J Surg Res* 2001;96:173-82.

86. Sakallioğlu EE, Alyev E, Luftioğlu M, Yavuz U, Acikoz G. VEGF levels of gingiva and gingival crevicular fluid in diabetic and systemically healthy periodontitis patient. *Clin Oral Invest* 2007;11:115-20.
87. Ünlü F, Güneri PG, Hekimgil M, Yesilbek B, Boyacioglu H. Expression of vascular endothelial growth factor in human periodontal tissues: comparison of healthy and diabetic patients. *J Periodontol* 2003;74:181-87.
88. Keles GC, Cetinkaya BO, Eroglu C, Simsek SB, Kahraman H. Vascular endothelial growth factor expression levels of gingiva in gingivitis and periodontitis patients with/without diabetes mellitus. *Inflamm Res.* 2010;59:543-9.
89. Güneri P, Unlü F, Yeşilbek B, Bayraktar F, Kokuludağ A, Hekimgil M, et al. Vascular endothelial growth factor in gingival tissues and crevicular fluids of diabetic and healthy periodontal patients. *J Periodontol* 2004;75:91-7.
90. Yki-Järvinen H. Treatment of hyperglycemia in adult-onset diabetes mellitus. *Duodecim.* 1999;115:1155-64.
91. Chávez EM, Borrell LN, Taylor GW, Ship JA: A longitudinal analysis of salivary flow in control subjects and older adults with type 2 diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91:166-73.
92. Newrick PG, Bowman C, Green D, O'Brien IA, Porter SR, Scully C, Corrall RJ. Parotid salivary secretion in diabetic autonomic neuropathy. *J Diabet Complications* 1991;5:35-7.

93. Guggenheimer J, Moore P, Rossie K, Mzers D, Mongelluyyo MB, Block H et al: Insulin-dependent diabetes mellitus and oral soft tissue pathologies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2000;89:5.
94. De Lima DC, Nakata GC, Balduci I, Almeida JD. Oral manifestations of diabetes mellitus in complete denture wearers. *J Prosthet Dent* 2008;99:60-5.
95. Collin HL, Niskanen L, Tozrz J, Collin P, Kovisto AM, Viina Maki H, Meurman JH: Oral symptoms and signs in elderly patients with type 2 diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2000;90:299-305.
96. Lin CC, Sun SS, Kao A, Lee CC. Impaired salivary function in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus with xerostomia. *J Diabetes Complications* 2002;16:176-9.
97. Astor FC, Hanft KL, Ciocon JO. Xerostomia: a prevalent condition in the elderly. *Ear Nose Throat J* 1999;78:476-9.
98. Sandberg GE, Sundberg HE, Fjellstrom CA, Wikblad KF. Type 2 diabetes and oral health: a comparison between diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetes Res Clin Pract* 2000;50:27-34.
99. Tommasi AF. *Diagnostico em patologia buccal*. 2 ed Sao Paulo, Brasil: Editora Pancast 1997.p.527-58.
100. Sousa RR, Castro RD, Monteiro CH et al. O paciente odontologico portador de diabetes mellitus: Uma revisao de literatura. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr* 2003;3:71-7.

101. Yuli M, Muller A, Yuraima P. Manifestaciones bucales de la diabetes mellitus gestacional. *Acta Odontol Venez* 2002;40:160-4.
102. Negrato CA, Tarzia O. Buccal alterations in diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr* 2010;2:3.
103. Paecho ECM, Reis LL, Dutra SMV, Rocha RF, Mancini MNG. Effects of diabetes mellitus types 1 and 2 on saliva secretion and composition in humans. *Braz J Oral Sci* 2005;4:854.
104. Carda C, Mosquera-Lloreda N, Salom L, Gomez de Ferraris ME, Peydró A. Structural and functional salivary disorders in type 2 diabetic patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11:309-14.
105. Rayfield EJ, Ault MJ, Keusch GT, Brothers MJ, Nechemias C, Smith H. Infection and diabetes: the case for glucose control. *Am J Med* 1982;72:439-50.
106. Devlin H, Garland H, Sloan PJ. *Oral Maxillofac Surg*. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus 1996;54:1087-91.
107. Graves DT, Liu R, Alikhani M, Al-Mashat H, Trackman PC. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis--impact on periodontal pathology. *J Dent Res* 2006; Jan;85:15-21.
108. Darby IA, Bisucci T, Hewitson TD, MacLellan DG. Apoptosis is increased in a model of diabetes-impaired wound healing in genetically diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:191-200.



109. Al-Mashat HA, Kandru S, Liu R, Behl Y, Desta T, Graves DT: Diabetes enhances mRNA levels of proapoptotic genes and caspase activity, which contribute to impaired healing. *Diabetes* 2006;55:487-95.
110. Desta T, Li J, Chino T, Graves DT. Altered fibroblast proliferation and apoptosis in diabetic gingival wounds. *J Dent Res* 2010;89:609-14.
111. Rai NK, Suryabhan, Ansari M, Kumar M, Shukla VK, Tripathi K. Effect of glycaemic control on apoptosis in diabetic wounds. *J Wound Care* 2005;14:277-81.
112. Aronovich S, Skope LW, Kelly JP, Kyriakides TC. The relationship of glycemic control to the outcomes of dental extractions. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:2955-61.
113. Sreebny LM. Dry mouth and salivary gland hypofunction, Part III: Treatment. *Compendium* 1988;9:716-7,720-1.
114. Cumming CG, Wight C, Blackwell CL, Wray D. Denture stomatitis in the elderly. *Oral Microbiol Immunol* 1990;5:82-5.
115. Daniluk T, Tokajuk G, Stokowska W, Fiedoruk K, Sciepek M, Zaremba ML et al. Occurrence rate of oral *Candida albicans* in denture wearer patients. *Adv Med Sci* 2006;51 Suppl 1:77-80.
116. Picton DC, Wills DJ. Viscoelastic properties of the periodontal ligament and mucous membrane. *J Prosthet Dent* 1978;40:263-72.
117. Wills DJ, Manderson RD. Biomechanical aspects of the support of partial dentures. *J Dent* 1977;5:310-8.

118. Ishizaki K, Sakurai K, Tazaki M, Inoue T. Response of Merkel cells in the palatal rugae to the continuous mechanical stimulation by palatal plate. *J Res* 2006;23:63-72.
119. Mori S, Sato T, Hara T, Nakashima K, Managi S. Effect of continuous pressure on histopathological changes in denture – supporting tissues. *J Oral Reh* 1997;24:37-46.
120. Akazawa H, Sukurai K. Changes of blood flow in the mucosa underlying a mandibular denture following pressure assumed as result of light clenching. *J Oral Reh* 2002;29:336-40.
121. Tsuruoka M, Ishizaki K, Sakurai K, Matsuzaka K, Inoue T. Morphological and molecular changes in denture supporting tissues under persistent mechanical stress in rats. *J Oral Reh* 2008; 35; 889-97.
122. Maruo Y, Sato T, Hara T, Shirai H. The effect of diabetes mellitus on histopathological changes in the tissues under denture base bearing masticatory pressure. *J Oral Reh* 1999;26;345-55.
123. Mori S, Sato T, Hara T, Shirai H, Maruo Y, Minagi S. The effect of diabetes mellitus on histopathological changes in the denture supporting tissues under continuous mechanical pressure in rat. *J Oral Reh* 1999;26:80-90.
124. Shirai H, Sato T, Hara T, Minagi S. The effect of diabetes mellitus on histopathological changes in the tissues under denture base and without mechanical pressure. *J Oral Reh* 1998; 25:715-20.

125. Abbas NA, Moussa MM, Nada MA. Ultrastructural, histological and histochemical study of denture bearing mucosa of complete dentures with soft liner in diabetic patients. *Egypt Dent J* 1987;33:405-24.
126. Newton AV. Denture sore mouth: a possible etiology. *Br Dent J* 1962;112:357-60.
127. Hoad-Reddick G, Grant AA, Griffiths CS. Investigation into the cleanliness of dentures in an elderly population. *J Prosthet Dent* 1990;64:48-52.
128. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999;341:738-46.
129. Swift ME, Kleinman HK, DiPietro LA. Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab Invest* 1999;79:1479-87.
130. Mathieu D, Linke J-C, Wattel F. Non-healing wounds. In: *Handbook on hyperbaric medicine*, Mathieu DE, editor. Springer 2006;pp 401-427.
131. Woo K, Ayello EA, Sibbald RG. The edge effect: current therapeutic options to advance the wound edge. *Adv Skin Wound Care*. 2007 Feb;20:99-117; quiz 118-9.
132. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev* 2004;25:612-28.
133. Loots MA, Lamme EN, Zeegelaar J, Mekkes JR, Bos JD, Middelkoop E. Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *J Invest Dermatol* 1998;111:850-7.

134. Sibbald RG, Woo KY. The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2008;24:25-30.
135. Wu Y, Wang J, Scott PG, Tredget EE. Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Repair Regen* 2007;15:18-26.
136. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1219-22.
137. Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, Chen H, Goldstein LJ, Buerk DG, et al. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha. *J Clin Invest* 2007;117:1249-59.
138. Quattrini C, Jeziorska M, Boulton AJ, Malik RA. Reduced vascular endothelial growth factor expression and intra-epidermal nerve fiber loss in human diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 2008;31:140-5.
139. Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N. 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;164:1935-47.
140. Jainkittivong A, Aneksuk V, Langlais RP. Oral mucosal conditions in elderly dental patients. *Oral Dis* 2002;8:218-23.
141. Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *J Oral Rehabil* 2002;29:1115-9.

142. Collis JJ, Stafford GD. A survey of denture hygiene in patients attending Cardiff Dental Hospital. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 1994;3:67-71.
143. Jeganathan S, Payne JA, Thean HP. Denture stomatitis in an elderly edentulous Asian population. *J Oral Rehabil* 1997;24:468-72.
144. Barbeau J, Séguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;95:51-9.
145. MacEntee MI, Glick N, Stolar E. Age, gender, dentures and oral mucosal disorders. *Oral Dis* 1998;4:32-6.
146. Aly FZ, Blackwell CC, MacKenzie DA, Weir DM. Identification of oral yeast species isolated from individuals with diabetes mellitus. *Mycoses* 1995;38:107-10.
147. Abu-Elteen KH, Abu-Alteen RM. The prevalence of *Candida albicans* populations in the mouths of complete denture wearers. *New Microbiol* 1998;21:41-8.
148. Rossie K, Guggenheimer J. Oral candidiasis: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 1997; 9:635-41.
149. Peterson DE. Oral candidiasis. *Clin Geriatr Med* 1992;8:513-27.
150. Lucas VS. Association of psychotropic drugs, prevalence of denture-related stomatitis and oral candidosis. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1993;21:313-6.

151. Budtz-Jorgensen E. Prosthodontics for Elderly. Diagnosis and treatment. Chicago: Quintessence Publishing Co., inc. Ed;1999.
152. Oki K, Sato T, Hara T, Minagi S. Histopathological changes in the tissues under a denture base in experimental osteoporosis with a non-pressure covering or bearing continuous pressure. *J Oral Rehabil* 2002;29:594-603.
153. Kydd WL, Stroud W, Moffett BC Jr, Tamarin A. The effect of mechanical stress on oral mucoperiosteum of dogs. *Arch Oral Biol* 1969;14:921-33.
154. Imai Y, Sato T, Mori S, Okamoto M. A histomorphometric analysis on bone dynamics in denture supporting tissue under continuous pressure. *J Oral Rehabil* 2002;29:72-9.
155. Atasever NE, Ercan MT, Naldöken S, Ulutuncel N. Effect of wearing complete dentures on human palatal mucosal blood flow measured by <sup>133</sup>Xe clearance. *Arch Oral Biol* 1991;36:627-30.

## SKRAĆENICE

VEGF - Vaskularni endotelni faktor rasta

DM - Dijabetes melitus

ITZP - Imedijatna totalna zubna proteza

TP - Totalna proteza

PPZP - Parcijalna pločasta zubna proteza

N - Broj ispitanika / eksperimentalnih životinja

VAS - Vizuelna analogna skala

VRS - Verbalna analogna skala

## BIOGRAFIJA

Mr sc. dr Katarina Radović rođena je 1974. godine u Beogradu. Osnovnu školu i Petu beogradsku gimnaziju završila je u Beogradu. Diplomirala je na Stomatološkom fakultetu u Beogradu 1999. godine sa prosečnom ocenom 9,13.

Dr Katarina Radović je upisala magistarske studije 1999. godine na Klinici za stomatološku protetiku, gde je i primljena 2000. godine u zvanje asistenta pripravnika, a od 2008. je u zvanju asistenta. Specijalistički ispit iz specijalnosti Stomatološka protetika, dr Katarina Radović položila je 2005. godine, a magistarsku tezu pod naslovom “Terapija krezubosti jednostranom parcijalnom protezom” odbranila je 2007. godine.

Dr Katarina Radović učestvuje u izvodjenju nastave na predmetima Dentalna anatomija, Osnovi gnatologije-pretklinika, Mobilna stomatološka protetika i Fiksna stomatološka protetika, kao i u edukaciji doktora stomatologije na obaveznom lekarskom stažu i na specijalizaciji iz oblasti Stomatološke protetike.

Mr sc. dr Katarina Radović je do sada saopštila 28 naučnih i stručnih radova na domaćim i svetskim kongresima i uzela učešće kao predavač po pozivu na dva stručna skupa. Objavila je do sada 5 radova u časopisima na SCI listi. Učestvuje kao član projektnog tima na projektu Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije. Član je Balkanskog udruženja stomatologa (BASS) i Sekcije za stomatološku protetiku (SLD).



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Katarina Radović

Број уписа 169

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом „Vaskularni endotelni faktor rasta u gingivi i pljuvački u dijabetes melitusu: značaj za mehanički stres i oralnu homeostazu kod pacijenata sa imecijatnim mobilnim zubnim nadoknadama“

- 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.

У Београду, 04.12.2013.

Потпис докторанда

K. Radović

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Katarina Radović

Број уписа 169

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада: „Vaskularni endotelni faktor rasta u gingivi i pljuvački u dijabetes melitusu: značaj za mehanički stres i oralnu homeostazu kod pacijenata sa imedijatnim mobilnim zubnim nadoknadama“

Ментор Prof. dr Dragica Stojić

Потписани Katarina Radović

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 04.12.2013.

K. Radović

Прилог 3.

### Изјава о коришћењу

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

„Vaskularni endotelni faktor rasta u gingivi i pljuvački u dijabetes melitusu: značaj za mehanički stres i oralnu homeostazu kod pacijenata sa imedijatnim mobilnim zubnim nadoknadama“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

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

У Београду, 04.12.2013.

Потпис докторанда  
K. Radović