

UNIVERZITET U BEOGRADU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Ljiljana L. Đukić

ACE INHIBITORI, ENALAPRIL, I
MEHANIZMI ORALNE HOMEOSTAZE:
PROTOK PLJUVAČKE I
ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Ljiljana L. Đukić

**ACE INHIBITORS, ENALAPRIL, AND
MECHANISMS OF ORAL
HOMEOSTASIS: SALIVARY FLOW RATE
AND ANTIOXIDANT CAPACITY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

MENTOR:

Prof dr Dragica Stojić

Redovni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

KOMENTOR:

Doc dr Jelena Roganović

Docent Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

KOMISIJA ZA OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:

Prof dr Elena Kršljak

Redovni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof dr Milan Brajović

Redovni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof dr Miroslav Radenković

Vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

DATUM ODBRANE:

ZAHVALNICA

Najiskreniju zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr Dragici Stojić koja me je uvela u svet nauke već od studentskih dana i strpljivo, profesionalno i stručno vodila tokom doktorskih studija. Hvala joj na ukazanoj časti, privilegiji i poverenju da budem član njenog naučnoistraživačkog tima, što je nesebično delila svoje veliko znanje i iskustvo, odgovarala stručno i iskreno na sva moja pitanja, rešavala nedoumice i uvek me sa punom pažnjom saslušala kao učitelj i prijatelj. Veliko mi je zadovoljstvo što je ova doktorska disertacija rezultat naše uspešne saradnje.

Zahvaljujem se svom komentoru doc. dr Jeleni Roganović koja me je prihvatila kao saradnika, nesebično sa profesionalnošću uvela u eksperimentalne farmakološke metode i osposobila za samostalan rad. Hvala joj na razumevanju, podršci i sugestijama tokom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se prof. dr Božidaru Brkoviću, rukovodiocu projekta „Kontrola bola i molekularni mehanizmi kao faktori regenerativne terapije u stomatologiji kod zdravih i pacijenata sa dijabetes melitusom“ Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (br. 175021), a čiji deo predstavlja ova doktorska disertacija, na obezbeđivanju potrebnih reagenasa bez kojih izrada disertacije ne bi bila moguća.

Zahvaljujem se prof. dr Milanu Brajoviću na velikoj pomoći u obezbeđivanju učesnika studije iz grupe pacijenata na antihipertenzivnoj terapiji.

Prof. dr Georgini Pudar se zahvaljujem na velikoj pomoći u obezbeđivanju učesnika studije iz grupe hipertenzivnih pacijenata sa DM tip 2.

Zahvaljujem se doc dr Živoradu Nikoliću, kao i medicnskom osoblju Klinike za maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu, na pomoći pri obezbeđivanju uzoraka za ispitivanje komponenti angiotenzinskog sistema u parotidnoj pljuvačnoj žlezdi.

Zahvaljujem se prof dr Mirosalvu Radenkoviću na mogućnosti da deo pripreme uzoraka obavim u laboratoriji kojom rukovodi, kao i na podršci tokom izrade disertacije.

Zahvaljujem se asist. dr Marku Stojanoviću na podršci, razumevanju i prijateljstvu tokom izvođenja ELISA protokola.

Prof dr Eleni Kršljak se zahvaljujem na ukazanoj podršci i sugestijama.

Spomenki Lučić, laboratorijskom tehničaru, zahvaljujem se na nesebičnoj pomoći pri laboratorijskim postupcima tokom prikupljanja uzoraka.

Zahvaljujem se zaposlenima Doma zdravlja „Dr Jovan Jovanović Zmaj“ u Staroj Pazovi na pomoći u obezbeđivanju učesnika studije.

Zahvaljujem se svim članovima kolektiva OJ Institutski predmeti Stomatološkog fakulteta u Beogradu na podršci i pomoći tokom izrade ovog rada.

Posebno bih se zahvalila svojim roditeljima, Zorici i Lazaru, kao i sestri Dušici za pruženu podršku, podsticaj, razumevanje i pomoć tokom izrade doktorske disertacije. Najlepše vam hvala.

Đukić Ljiljana

ACE INHIBITORI, ENALAPRIL, I MEHANIZMI ORALNE HOMEOSTAZE: PROTOK PLJUVAČKE I ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA

REZIME

Uvod: Pljuvačka je medijum koji svojim komponentama, protokom i antioksidativnim kapacitetom, u velikoj meri doprinosi oralnoj homeostazi. Najčešći faktori odgovorni za nastanak smanjenog lučenja pljuvačke i/ili kserostomije (subjektivni osećaj suvoće usta) su neželjeni efekti lekova, kao što su antihipertenzivi, i bolesti, kao što je dijabetes melitus (DM) tip 2. ACE inhibitori danas predstavljaju lekove prvog izbora za lečenje, kako esencijalne hipertenzije, tako i hipertenzije udružene sa DM tip 2. Za sada nema dobro dokumentovanih kliničkih studija koje direktno ukazuju na kserogeni efekat ACE inhibitora. Povoljnom terapijskom efektu ACE inhibitora, pored njihovog direktnog dejstva na komponente angiotenzinskog sistema, značajno doprinose i njihovi protektivni efekti (antioksidativni, antiproliferativni, antioagregacioni). O pomenutim efektima ACE inhibitora na nivou pljuvačnih žlezda i pljuvačke kod ljudi za sada nema podataka.

Ciljevi: 1. Odrediti protok ukupne nestimulisane pljuvačke (UNP) kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2 na terapiji enalaprilom (ACE inhibitor), kao i kod zdravih osoba; 2. Utvrditi prisustvo subjektivnog osećaja suvoće usta kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2 na terapiji enalaprilom, kao i kod zdravih osoba; 3. Odrediti prisustvo i koncentracije ACE i ACE2 u UNP prikupljenoj 1 sat pre (minimalne koncentracije) i 4 sata posle (maksimalne koncentracije) primene jutarnje terapijske doze enalaprila kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2 na terapiji ovim lekom, kao i kod zdravih osoba; 4. Odrediti stepen oksidativnog stresa na nivou lipidne peroksidacije merenjem malondialdehida (MDA) vezanog za proteine u UNP prikupljenoj 1 sat pre i 4 sata posle primene jutarnje terapijske doze enalaprila kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2 na terapiji ovim lekom, kao i kod zdravih osoba; 5. Odrediti stepen antioksidativnog kapaciteta merenjem totalnog antioksidativnog kapaciteta (TAC), koncentracija ukupnog glutaciona i aktivnosti superoksid dizmutaze - SOD u UNP prikupljenoj 1 sat pre i 4 sata posle primene jutarnje terapijske doze enalaprila kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2 na terapiji ovim lekom, kao i kod zdravih osoba; 6. Utvrditi prisustvo komponenti angiotenzinskog sistema u tkivu

parotidne pljuvačne žlezde čoveka: ACE, ACE2 i receptor za angiotenzin II tip 1 (AT₁ receptor); 7. Odrediti koncentracije enzima za sintezu azot monoksida (NO) - eNOS i iNOS, u UNP prikupljenoj 1 sat pre i 4 sata posle primene jutarnje terapijske doze enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2 na terapiji ovim lekom, kao i kod zdravih osoba.

Materijal i metode: Ova randomizovana studija preseka sa statistički potvrđenom snagom studije je sprovedena na ukupno 217 učesnika starosti 50 – 70 godina, oba pola. Grupa od 197 učesnika uključena u ispitivanje efekata enalapрила na nivou pljuvačke - protok UNP i kserostomija, podeljena je u 3 podgrupe: pacijenti sa hipertenzijom (N=105), pacijenti sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 (N=32) i zdravi učesnici (N=60) kao kontrola. Iz svake od ovih podgrupa za laboratorijska ispitivanja pljuvačke (koncentracije ACE, ACE2, MDA vezanog za proteine, eNOS i iNOS) je metodom slučajnog izbora izabrano po 16 ispitanika. Kod preostalih 20 učesnika kod kojih je bilo indikovano hirurško lečenje benignih tumora parotidne pljuvačne žlezde analizirane su komponente angiotenzinskog sistema (ACE, ACE2 i AT₁ receptori) u tkivu i krvnim sudovima parotidne žlezde.

Kserostomija je ispitivana primenom upitnika. Protok UNP je meren metodom ispljuvavanja. Prisustvo i koncentracije ACE, ACE2, AT₁ receptora, MDA vezanog za proteine, eNOS i iNOS su određeni imunoesejskom metodom (ELISA), a za određivanje nivoa TAC, koncentracije ukupnog glutaciona i aktivnosti SOD korišćena je spektrofotometrijska metoda.

Rezultati: Učestalost kserostomije i protok UNP kod pacijenata sa hipertenzijom na terapiji enalaprilom i zdravih učesnika se nisu razlikovali značajno, dok su značajno veća učestalost kserostomije i značajno manji protok UNP zabeleženi kod pacijenata sa hipertenzijom sa DM tip 2 u odnosu na zdrave učesnike. Binarna logistička regresiona analiza je pokazala da je DM tip 2 faktor rizika za pojavu, kako kserostomije, tako i smanjenog protoka UNP, u populaciji hipertenzivnih pacijenata na terapiji enalaprilom.

Koncentracije MDA vezanog za proteine, markera lipidne peroksidacije, u UNP pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2 pre primene enalapрила su bile slične onima kod zdravih. U UNP 4 sata posle primene enalapрила koncentracije MDA vezanog za proteine su bile značajno niže kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2 u odnosu na zdrave. Koncentracije TAC - indikatora

antioksidativne zaštite, ukupnog glutaciona - komponente neenzimske antioksidativne zaštite, i aktivnost SOD - komponente enzimske antioksidativne zaštite, u UNP pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2 pre i posle primene enalapрила su bile slične onim kod zdravih. Koncentracije TAC i ukupnog glutaciona u UNP u odnosu na vreme primene enalapрила (1 sat pre i 4 sata posle), nisu bile značajno različite kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2. Aktivnost SOD u UNP u odnosu na vreme primene enalapрила, kod pacijenata sa hipertenzijom je bila značajno manja posle primene leka nego pre primene. Kod pacijenata sa hipertenzijom sa DM tip 2 nije bilo značajne razlike u aktivnosti SOD u odnosu na vreme primene leka. Priliv ukupnih antioksidanasa u UNP pacijenata sa hipertenzijom pre i posle primene enalapрила je bio sličan onom kod zdravih učesnika, dok je kod pacijenata sa hipertenzijom sa DM tip 2 bio značajno manji u odnosu na zdrave. Priliv ukupnog glutaciona u UNP pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2 pre i posle primene enalapрила je bio sličan onom kod zdravih učesnika. Između priliva ukupnih antioksidanasa i protoka UNP postojala je značajna pozitivna korelacija, kako u celoj populaciji (pacijenti sa hipertenzijom, hipertenzijom sa DM tip 2 i zdravi), tako i populaciji pacijenata na terapiji enalaprilom (pacijenti sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2). Značajna negativna korelacija između priliva glutaciona i protoka UNP postojala je u populaciji zdravih učesnika, dok je korelacija izostala u celoj populaciji i populaciji pacijenata na terapiji enalaprilom.

Za komponente angiotenzinskog sistema pokazano je da su koncentracije ACE u UNP zdravih učesnika bile značajno veće od koncentracija ACE2. Koncentracije ACE2 u tkivu parotidne pljuvačne žlezde zdravih osoba su bile značajno veće od koncentracija ACE. U krvnim sudovima parotidne pljuvačne žlezde zdravih osoba nije bilo značajne razlike između koncentracija ACE i ACE2. U odnosu na poreklo enzima – UNP, žlezdano tkivo i krvni sudovi, nije bilo značajne razlike u koncentracijama ACE među ispitivanim tkivima, dok su značajno veće koncentracije ACE2 bile prisutne u tkivu i krvnim sudovima parotidne žlezde u odnosu na UNP zdravih učesnika. U krvnim sudovima količina AT₁ receptora je bila značajno veća u odnosu na onu u tkivu žlezde. Koncentracije ACE u UNP pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2 pre i posle primene enalapрила su bile slične onim kod zdravih. Koncentracije ACE u UNP u odnosu na vreme primene enalapрила nisu bile značajno različite kod pacijenata sa

hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2. Koncentracije ACE2 u UNP pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2 jedan sat pre primene enalapрила su bile značajno veće od onih kod zdravih. U odnosu na zdrave učesnike, u UNP 4 sata nakon primene enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom postojala je značajno veća koncentracija ACE2, dok kod pacijenata sa hipertenzijom sa DM tip 2 koncentracija ACE2 nije bila statistički značajno različita. Koncentracije ACE2 u UNP u odnosu na vreme primene enalapрила su bile slične kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2.

Analiza NO sistema je pokazala da nema razlike u koncentracijama eNOS u UNP pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2 jedan sat pre primene enalapрила u odnosu na zdrave. U pljuvački prikupljenoj 4 sata posle primene enalapрила koncentracije eNOS su bile slične kod zdravih i pacijenata sa hipertenzijom, dok su kod pacijenata sa hipertenzijom sa DM tip 2 bile veće u odnosu na zdrave. Koncentracije iNOS u UNP pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2 pre i posle primene enalapрила su bile slične onima kod zdravih. Koncentracije iNOS u UNP u odnosu na vreme primene enalapрила su bile slične, kako kod pacijenata sa hipertenzijom, tako i pacijenata sa hipertenzijom sa DM tip 2.

Zaključci: Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2 enalapril, ACE inhibitor, nema kserogeni efekat (kserostomija i smanjeno lučenje pljuvačke) i da se kserogeni efekat zapažen kod pacijenta sa hipertenzijom sa DM tip 2 može pripisati efektu diabetesa. Enalapril nema ovaj neželjeni oralni efekat zahvaljujući svom direktnom delovanju na angiotenzinski sistem: ACE inhibicija i sledstveno smanjenje angiotenzina II i povećanje bradikininina, povećanje koncentracije ACE2 i sledstveno povećanje angiotenzina (1-7), što doprinosi povećanom protoku krvi kroz pljuvačne žlezde. S druge strane, izostanku kserogenog efekta doprinose i indirektni, protektivni efekti enalapрила pokazani na nivou njegovog antioksidativnog delovanja i modulacije elemenata NO sistema u pljuvački. U vezi sa tim, od značaja je i nalaz da se ovi protektivni efekti na nivou kompleksa pljuvačna žlezda – pljuvačka vide i pri minimalnim koncentracijama enalapрила.

KLJUČNE REČI: ACE inhibitori; enalapril; angiotenzinski sistem; pljuvačne žlezde; kserostomija; protok pljuvačke; antioksidativni kapacitet pljuvačke; NOS; dijabetes melitus tip 2.

NAUČNA OBLAST: Stomatološke nauke

UŽA NAUČNA OBLAST: Bazične stomatološke nauke

UDK broj: 616-008.843.1:615.224(043.3)

**ACE INHIBITORS, ENALAPRIL, AND MECHANISMS OF ORAL
HOMEOSTASIS: SALIVARY FLOW RATE AND ANTIOXIDANT CAPACITY
SUMMARY**

Introduction: Saliva is a medium which, due to its components, flow rate and antioxidant capacity, greatly contributes to the oral homeostasis. The most common factors causing reduced salivary flow rate and/or xerostomia (subjective feeling of dry mouth) are adverse oral reactions of drugs, such as antihypertensives, and diseases, such as diabetes mellitus (DM) type 2. ACE inhibitors are the first-line antihypertensive drugs for the control of essential hypertension and hypertension with DM type 2. For the time being, there are no well-controlled clinical trials showing xerogenic effect of ACE inhibitors. Beside ACE inhibitors direct effect on angiotensin system components, their protective effects (antioxidant, antiproliferative, antithrombotic) also significantly contribute to the beneficial therapeutic effects of these drugs. However, for the moment there are no data regarding mentioned effects of ACE inhibitors in human salivary glands and saliva.

Aims: This study aimed: (1) to determine unstimulated whole saliva (UWS) flow rate in hypertensive patients with and without DM type 2 on enalapril (ACE inhibitor) treatment, as well as in healthy subjects; (2) to determine the presence of xerostomia in hypertensive patients with and without DM type 2 on enalapril treatment, as well as in healthy subjects; (3) to determine ACE and ACE2 presence and concentration in UWS sampled one hour before (minimal concentrations) and 4 hours after (maximal concentrations) enalapril morning dose intake in hypertensive patients with and without DM type 2 on enalapril treatment, as well as in healthy subjects; (4) to determine concentrations of malondialdehyde (MDA) adducts, marker of oxidative stress-lipid peroxidation, in UWS sampled one hour before and 4 hours after enalapril morning dose intake in hypertensive patients with and without DM type 2 on enalapril treatment, as well as in healthy subjects; (5) to determine antioxidant capacity by measuring total antioxidant capacity (TAC) and total glutathione concentration, as well as superoxide dismutase (SOD) activity in UWS sampled one hour before and 4 hours after enalapril morning dose intake in hypertensive patients with and without DM type 2 on enalapril treatment, as well as in healthy subjects; (6) to determine presence of angiotensin system components (ACE, ACE2, AT₁ receptors) in human parotid gland tissues; (7) to

determine eNOS and iNOS presence and concentrations in UWS sampled one hour before and 4 hours after enalapril morning dose intake in hypertensive patients with and without DM type 2 on enalapril treatment, as well as in healthy subjects.

Materials and methods: This randomized cross-sectional study with obtained high power of the study enrolled in total 217 subjects 50-70 years old of both genders. Group comprised of 197 subjects enrolled in a study of enalapril effects in saliva – UWS flow rate and xerostomia, was divided into 3 subgroups: hypertensive patients (N=105), hypertensive patients with DM type 2 (N=32) and healthy subjects (N=60) as control. For laboratory analyses of UWS (ACE, ACE2, MDA adducts, eNOS, iNOS) 16 subjects were randomly selected from each subgroup. In remaining 20 patients diagnosed with parotid gland benign tumors and scheduled for surgical treatment angiotensin system components (ACE, ACE2, AT₁ receptors) were studied in human parotid gland tissues and blood vessels.

Xerostomia was assessed by a questionnaire. UWS flow rate was determined by spitting method. Presence and concentrations of ACE, ACE2, AT₁ receptors, MDA adducts, eNOS and iNOS were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method, while spectrophotometry was used for TAC, total glutathione and SOD measurements.

Results: Frequency of xerostomia and UWS flow rates were similar in hypertensive patients on enalapril therapy and healthy subjects, while significantly higher xerostomia frequency and significant reduction of UWS flow rate were observed in hypertensive patients with DM type 2 compared to healthy subjects. The binary logistic regression analyses, unadjusted and adjusted, showed that DM type 2 was a risk factor for xerostomia and reduced UWS flow rate development in whole population of patients treated with enalapril (hypertensive patients with and without DM type 2).

MDA adducts concentrations, marker of lipid peroxidation, in UWS of hypertensive patients with and without DM type 2 before enalapril intake were similar to those observed in healthy subjects. After enalapril intake in UWS of hypertensive patients with and without DM type 2 MDA adducts concentrations was significantly lower comparing to those in healthy subjects. Concentrations of TAC – indicator of antioxidant protection, total glutathione – non-enzymatic antioxidant system component, and SOD activity - enzymatic antioxidant system component, in UWS of

hypertensive patients with and without DM type 2 before and after enalapril intake were similar to those observed in healthy subjects. Comparison of TAC and total glutathione concentrations in UWS regarding the time of enalapril intake (one hour before and 4 hours after) showed no statistical differences in hypertensive patients with and without DM type 2. Comparison of SOD activity in UWS regarding the time of enalapril intake showed lesser activity of SOD after enalapril intake compared to those before enalapril intake in hypertensive patients, while no statistical differences in SOD activity were observed in hypertensive patients with DM type 2. TAC flow in UWS of hypertensive patients before and after enalapril intake was similar to those observed in healthy subjects, while in hypertensive patients with DM type 2 TAC flow was significantly reduced compared to healthy subjects. Total glutathione flow in UWS of hypertensive patients with and without DM type 2 before and after enalapril intake was similar to those observed in healthy subjects. Positive correlation between TAC flow and UWS flow rate was observed in whole population (hypertensive patients with and without DM type 2 treated with enalapril and healthy subjects) and population treated with enalapril (hypertensive patients with and without DM type 2). Negative correlation between total glutathione flow and UWS flow rate was observed in healthy subjects, while there was no correlation in whole population and population treated with enalapril.

Results regarding angiotensin system components showed that ACE concentrations in UWS of healthy subjects were significantly higher compared to ACE2 concentrations. ACE2 concentrations in parotid gland tissue of healthy subjects were significantly higher than ACE concentrations. There were no differences between ACE and ACE2 concentrations in parotid gland blood vessels of healthy subjects. Results showed no differences in ACE concentrations between studied tissues, while significantly higher ACE2 concentrations were present in parotid gland tissue and blood vessels than in UWS of healthy subjects. AT₁ receptors concentrations were significantly higher in parotid gland blood vessels than in parotid gland tissue. ACE concentrations in UWS of hypertensive patients with and without DM type 2 before and after enalapril intake were similar to those observed in healthy subjects. Comparison of ACE concentrations in UWS regarding the time of enalapril intake showed no statistical differences in hypertensive patients with and without DM type 2. ACE2 concentrations

in UWS of hypertensive patients with and without DM type 2 before enalapril intake were significantly higher than in healthy subjects. Compared to healthy subjects, ACE2 concentrations in UWS of hypertensive patients after enalapril intake were significantly higher, while in UWS of hypertensive patients with DM type 2 after enalapril intake differences in ACE2 concentrations were not observed compared to healthy subjects. Comparison of ACE2 concentrations in UWS regarding the time of enalapril intake showed no statistical differences in hypertensive patients with and without DM type 2.

NO system analyses showed no differences in eNOS concentrations in UWS of hypertensive patients with and without DM type 2 before enalapril intake and healthy subjects. In UWS after enalapril intake eNOS concentrations were similar between hypertensive patients and healthy subjects, while in hypertensive patients with DM type 2 were observed significantly higher eNOS concentrations compared to healthy subjects. iNOS concentrations in UWS of hypertensive patients with and without DM type 2 before and after enalapril intake were similar to those observed in healthy subjects.

Conclusions: According to the obtained results, enalapril (ACE inhibitor) does not have xerogenic effect (xerostomia and reduced saliva flow rate) in hypertensive patients with and without DM type 2, while xerogenic effect present in hypertensive patients with DM type 2 could be attributed to the effects of diabetes. Enalapril does not have this oral adverse effect owing to its direct effects on angiotensin system: ACE inhibition followed by reduction of angiotensin II and increase of bradykinin, ACE2 concentrations increase followed by angiotensin (1-7) increase, which contributes to the increase of blood flow in salivary glands. On the other hand, indirect, protective effects of enalapril observed at the level of its antioxidant effects and modulation of NO system elements in saliva also contribute to the absence of its xerogenic effect. In connection with this, results showing the presence of protective effects at salivary gland – saliva complex level in minimal concentrations of enalapril are also of importance.

KEY WORDS: ACE inhibitors, enalapril, angiotensin system, salivary glands, xerostomia, salivary flow rate, salivary antioxidant capacity, NOS, diabetes mellitus type 2.

SCIENTIFIC FIELD: Dental Sciences

SPECIFIC SCIENTIFIC FIELD: Basic Dental Sciences

UDC NUMBER: 616-008.843.1:615.224(043.3)

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. PLJUVAČKA U ORALNOJ HOMEOSTAZI	2
1.1. Kontrolni mehanizmi lučenja pljuvačke.....	2
1.2. Sastav i uloge pljuvačke.....	6
1.3. Smanjen protok pljuvačke.....	9
1.4. Antioksidativni potencijal pljuvačke.....	12
2. ANGIOTENZINSKI SISTEM.....	16
2.1. Komponente angiotenzinskog sistema.....	16
2.2. Odnos cirkulatornog i tkivnog angiotenzinskog sistema.....	21
2.3. Angiotenzinski sistem u pljuvačnim žlezdama.....	23
2.4. Interakcija angiotenzinskog i NO sistema.....	24
3. ACE INHIBITORI.....	27
3.1. Klasifikacija i farmakokinetika ACE inhibitora.....	27
3.2. Mehanizam antihipertenzivnog dejstva ACE inhibitora.....	28
3.3. Mehanizam protektivnog dejstva ACE inhibitora: oksidativni stres i NO.....	29
3.4. ACE inhibitori i sekrecija pljuvačke.....	31
4. ORALNA HOMEOSTAZA I ANGIOTENZINSKI SISTEM U DIJABETES MELITUSU.....	32
HIPOTEZE.....	35
CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	37
MATERIJAL I METODE.....	39
1. ISPITIVANA POPULACIJA.....	40
1.1. Kriterijumi za uključivanje i isključivanje iz studije.....	41
2. UZIMANJE UZORAKA ISPITIVANIH TKIVA I NJHOVA PRIPREMA ZA LABORATORIJSKE ANALIZE.....	42
2.1. Pljuvačka.....	42
2.2. Pljuvačne žlezde – tkivo i krvni sudovi parotidne žlezde.....	42
3. EKSPERIMENTALNE METODE.....	43
3.1. Kserostomija i protok ukupne nestimulisane pljuvačke.....	43
3.2. Imunoesejska (ELISA) metoda.....	44

3.3. Spektrofotometrijska metoda.....	45
3.4. Priliv antioksidanasa.....	46
4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	47
REZULTATI.....	50
1. DEMOGRAFSKI PODACI.....	51
2. KSEROSTOMIJA I STEPEN SALIVACIJE-UČESTALOST I KORELACIJA	53
3. ENALAPRIL I KSEROSTOMIJA.....	55
4. ENALAPRIL I PROTOK PLJUVAČKE.....	58
5. ENALAPRIL:OKSIDATIVNI STRES I ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA..	61
6. KONCENTRACIJE ACE I ACE2 U UKUPNOJ NESTIMULISANOJ PLJUVAČKI PACIJENATA NA TERAPIJI ENALAPRILOM I ZDRAVIH OSOBA, KAO I TKIVU I KRVNIM SUDOVIMA PAROTIDNE ŽLEZDE ZDRAVIH OSOBA	73
7. KONCENTRACIJE AT ₁ RECEPTORA U TKIVU I KRVNIM SUDOVIMA PAROTIDNE ŽLEZDE ZDRAVIH OSOBA.....	80
8. KONCENTRACIJE eNOS I iNOS U UKUPNOJ NESTIMULISANOJ PLJUVAČKI PACIJENATA NA TERAPIJI ENALAPRILOM I ZDRAVIH OSOBA	81
DISKUSIJA.....	86
ZAKLJUČCI.....	111
LITERATURA.....	116
BIOGRAFIJA AUTORA.....	157
Izjava o autorstvu.....	160
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada.....	161
Izjava o korišćenju.....	162

U V O D

1. PLJUVAČKA U ORALNOJ HOMEOSTAZI

Oralna homeostaza predstavlja skup mehanizama koji doprinose održavanju stabilnog stanja unutrašnje sredine usne duplje i ključna je za održavanje i očuvanje oralnih struktura. Pljuvačka je medijum koji svojim komponentama, protokom i antioksidativnim kapacitetom održava oralnu homeostazu.

1.1. Kontrolni mehanizmi lučenja pljuvačke

Pljuvačka predstavlja rezultat aktivnosti tri para velikih pljuvačnih žlezda (parotidna, submandibularna, sublingvalna), kao i velikog broja (450 – 750) malih žlezda (Aps i Martens, 2005). Pljuvačne žlezde se sastoje iz visoko diferenciranih ćelija žlezdanog epitela organizovanih u morfološke i funkcionalne celine: acinuse i sisteme izvodnih kanala. U lumenu acinusa se formira primarna pljuvačka izotoničnog karaktera, poreklom iz krvne plazme lokalne vaskularne mreže. Prolaskom kroz sistem izvodnih kanala, primarna pljuvačka se modifikuje (promena koncentracije elektrolita: reapsorpcija Na^+ i Cl^- , sekrecija HCO_3^- i K^+), te u usnu duplju izlučuje kao tečnost hipotoničnog karaktera u odnosu na krvnu plazmu (Baum, 1993). Kod ljudi, velike pljuvačne žlezde luče pljuvačku samo kada su stimulisane, dok male pljuvačne žlezde kontinuirano luče male količine pljuvačke tokom celog dana (Ekström i sar, 2012).

Primarnu ulogu u kontroli lučenja pljuvačke ima vegetativni nervni sistem, kako parasimpatikus, tako i simpatikus, koji inerviše sekretorne ćelije pljuvačnih žlezda, kao i njihove krvne sudove (Edwards, 1998; Proctor i Carpenter, 2007). Vegetativna nervna vlakna koja inervišu velike pljuvačne žlezde potiču iz parasimpatičkih jedara lokalizovanih u produženoj moždini (*medulla oblongata*) i moždanom mostu (*pons*), kao i iz simpatičkih gangliona koji sačinjavaju stablo vratnog simpatikusa (*truncus sympathicus*). Naime, parasimpatička vlakna poreklom iz donjeg salivarnog jedra (*nucleus salivatorius inferior*) glosofaringealnog živca (*n. glossopharyngeus*) lokalizovanog u produženoj moždini uključena su u holinergičku aktivaciju parotidne pljuvačne žlezde do koje stižu preko vegetativnog otičkog gangliona (*ganglion oticum*) i ušnoslepoočnog živca (*n. aurikulotemporalis*). Parasimpatička nervna vlakna poreklom iz gornjeg salivarnog jedra (*nucleus salivatorius superior*) facijalnog živca (*n. facialis*) lokalizovanog u moždanom mostu dolaze preko bubne vrpce (*chorda tympani*)

u submandibularni vegetativni ganglion gde prenose impulse na postganglijska parasimpatička vlakna za inervaciju submandibularne i sublingvalne pljuvačne žlezde. S druge strane, simpatička nervna vlakna uključena u adrenergičku aktivaciju pljuvačnih žlezda potiču iz gornjeg vratnog gangliona (*ganglion cervicale superius*) i oko spoljašnje karotidne arterije (*a. carotis externa*) obrazuju spoljašnji karotidni splet (*plexus carotis externus*). Ovaj splet se zatim račva u manje spletove koji prate krvne sudove (npr. *a. facialis*) sve do pljuvačnih žlezda kojima donose adrenergička vlakna.

Imunohistohemijskim metodama za identifikaciju acetilholinestaraze u holinergičkim neuronima, kateholaminskom fluorescencijom za analizu adrenergičkih neurona i elektronskom mikroskopijom za identifikaciju tipova neuroefektorne veze u pljuvačnim žlezdama, pokazano je da postoje značajne razlike u zastupljenosti i tipu vegetativnih vlakana u pljuvačnim žlezdama, kako između različitih životinjskih vrsta, tako i između velikih pljuvačnih žlezda jedne vrste (Garrett, 1987). Tako, na primer, u submandibularnoj pljuvačnoj žlezdi mačke je uočena veća gustina vegetativnih nervnih vlakana u odnosu na parotidnu žlezdu, dok je kod pacova identifikovan značajno veći broj adrenergičkih vlakana u submandibularnoj pljuvačnoj žlezdi za razliku od malobrojnih adrenergičkih vlakana prisutnih u sublingvalnoj žlezdi (Garrett i Anderson, 1991; Garrett, 1987). Kod čoveka, zapažena je sličnost u zastupljenosti vegetativne inervacije između parotidne i submandibularne pljuvačne žlezde, kao i primarna zastupljenost holinergičkih vlakana u odnosu na adrenergička, kod obe žlezde (Garrett, 1967). U istoj studiji, elektronskom mikroskopijom parotidne i submandibularne pljuvačne žlezde čoveka identifikovan je samo epilemalni tip neuroefektorne veze, gde je akson odvojen od efektorne ćelije bazalnom membranom, ali ne i hipolemalni, gde je akson u bliskom kontaktu sa ćelijom, ispod bazalne membrane.

U okviru neuroefektorne veze u pljuvačnim žlezdama prenos sekretornog signala se odvija pomoću neurotransmitera i njegove veze za specifične receptore na efektornim ćelijama (Baum, 1987). Primarni neurotransmiter odgovoran za holinergičku sekreciju pljuvačke je acetilholin (ACh) koji ovaj efekat ostvaruje primarno aktivacijom muskarinskih M_3 holinergičkih receptora. Adrenergička salivacija se ostvaruje posredstvom norepinefrina aktivacijom alfa1 i beta adrenoceptora (Baum, 1987; Proctor i Carpenter, 2007). Receptori, kako muskarinski, tako i adrenergički, pripadaju klasi transmembranskih receptora udruženih sa G proteinom čijom aktivacijom započinje

jedan od dva glavna transdukciona signala: prvi, koji uključuje stvaranje inozitol trifosfata (IP_3) i diacilglicerola (DAG) kao sekundarnih glasnika nakon aktivacije muskarinskih i alfa1 receptora, ili drugi, koji uključuje stvaranje cikličnog adenozin monofosfata (cAMP) nakon aktivacije beta receptora (Baum i sar, 1993). Karakteristike izlučene pljuvačke nakon aktivacije receptora, muskarinskih – pljuvačka bogata velikom količinom vode i elektrolita, alfa1 - pljuvačka bogata elektrolitima i malom količinom mucina i beta receptora - pljuvačka bogata proteinima, ukazuju da njen sastav i količina zavise od vrste vegetativne stimulacije (Matsuo i sar, 2000; Aps i Martens, 2005).

Pored vegetativnog nervnog sistema u kontroli aktivnosti pljuvačnih žlezda učestvuju i lokalni faktori poreklom iz žlezdanog tkiva i krvi, kao što su autokoidi (Matsuda i sar, 1997; Del Fiacco i sar. 2015; Healy i sar, 1976; Ikegami i sar, 2001; Yamada i sar, 2002; Ekström i Ekman, 2005). U studijama na animalnim modelima kao sekretogogi identifikovani su neuropeptidi: vazoaktivni intestinalni peptid (VIP), supstancija P, neuropeptid Y (NPY) (Ekström i sar, 1983; Ekström i Wahlestedt, 1982; Ekström i Olgart, 1986). Međutim, iako je dokazano prisustvo VIP, kao i supstancije P, u parotidnoj pljuvačnoj žlezdi čoveka (Matsuda i sar, 1997), Del Fiacco i sar (2015) su na tkivu parotidne i submandibularne pljuvačne žlezde čoveka pokazali da VIP, ali ne i supstancija P, učestvuje u parasimpatičkoj kontroli lučenja proteina pljuvačke. U humanim pljuvačnim žlezdama prisutan je i NPY i to u blizini acinusa i izvodnih kanala, kao i u blizini žlezdanih krvnih sudova (Hauser-Kronberger i sar, 1992; Kusakabe i sar, 1997). Periacinusna lokalizacija ovog neuropeptida, u većoj količini oko mukoznih acinusa, ukazuje na njegovu ulogu u mehanizmima sekrecije pljuvačke, dok perivaskularna ukazuje na ulogu u kontroli protoka krvi kroz lokalnu vaskularnu mrežu (Kusakabe i sar, 1997).

Ulogu u kontroli lučenja pljuvačke ima i angiotenzin II (Ang II), glavni efektorni molekul renin-angiotenzin sistema (RAS), koji pored cirkulatornog može imati i lokalno, tkivno poreklo. Ovaj hormon/autokoid nastaje, kako u cirkulaciji, tako i u tkivu, primarno pod dejstvom angiotenzin konvertirajućeg enzima (ACE). Healy i sar (1976) su pokazali da Ang II inhibiše reapsorpciju natrijuma u izvodnom kanalu mandibularne pljuvačne žlezde zeca. S druge strane, u submandibularnom ganglionu hrčka pokazano je da Ang II, preko svojih AT_1 receptora, inhibiše voltažno-zavisne

kalcijumske kanale i tako učestvuje u kontroli oslobađanja neurotransmitera uključenih u sekreciju pljuvačke (Ikegami i sar, 2001; Yamada i sar, 2002). Za sada nema podataka o prisustvu elemenata angiotenzinskog sistema, kao i njegovoj direktnoj funkciji u pljuvačnim žlezdama čoveka.

Značajnu ulogu u kontroli lučenja pljuvačke ima i bradikinin, autokoid i efektorni peptid kinin-kalikrein sistema. Bradikinin nastaje iz kininogena pod dejstvom kalikreina, žlezdanog enzima. Hilton i Lewis (1956) su na submandibularnoj pljuvačnoj žlezdi mačke pokazali da postoji konzistentni odnos između žlezdane aktivnosti, lokalne vazodilatacije i oslobađanja enzima koji sintetiše bradikinin. Pokazano je takođe da bradikinin potencira sekreciju submandibularne žlezde mačke izazvanu električnom stimulacijom *chorde tympani* (Stojić, 1999).

Od fundamentalnog značaja za sekreciju pljuvačke je i kontrola protoka krvi kroz krvne sudove pljuvačnih žlezda, stoga što vazodilatacija u krvnim sudovima pljuvačnih žlezda značajno doprinosi povećanju sekrecije pljuvačke, dok njihova vazokonstrikcija smanjuje sekreciju pljuvačke (Edwards, 1998). Lung (1998) je pokazala direktni odnos između sekrecije pljuvačke i protoka krvi kroz pljuvačne žlezde na modelu vaskularne perfuzije submandibularne pljuvačne žlezde kod anesteziranih pasa (*in vivo*). Dobijeni rezultati ukazuju na direktni odnos između venskog pritiska i sekrecije u toku parasimpatičke stimulacije (ACh, ia). Thakor i sar (2003) su pokazali na modelu submandibularne sekrecije anestezirane ovce da je električna stimulacija *chorde tympani* praćena povećanim protokom krvi kroz žlezdu i povećanim protokom pljuvačke, dok su posle primene endotelina-1, snažnog vazokonstriktora, oba efekta redukovana.

Postojanje ravnoteže između vazoaktivnih molekula (vazodilatatornih i vazokonstriktornih), kao i postojanje njihove fiziološke interakcije, ključno je za održavanje normalne vaskularne strukture i funkcije. Vazodilatatorne molekule, za koje je pokazano da pojačavaju i sekreciju pljuvačke su ACh, VIP, azot monoksid (NO), bradikinin i vazodilatatorni prostanoidi, a vazokonstriktorne molekule, čiji je efekat praćen smanjenjem sekrecije pljuvačke su norepinefrin, NPY, endotelin-1 i Ang II (Thakor i sar, 2003; Baum i Wellner, 1999; Stojić, 1999; Ekstrom, 1999; Stojić i sar, 2007; Stojić i sar, 2012, rev). Naime, ispitujući ulogu endotela u efektima ACh i VIP na izolovanoj facijalnoj arteriji kunića, Stojić i sar (2003) su pokazali da ACh izaziva

vazodilataciju oslobađajući NO i produkte ciklooksigenaze iz endotela, dok je vazodilatatorni efekat VIP posledica povećanja cAMP u glatkim mišićima krvnog suda i oslobađanje NO iz perivaskularnih nervih vlakana. Takođe, značaj endotela u vazodilatatornom efektu ACh i VIP pokazan je i na izolovanoj submandibularnoj arteriji čoveka (Stojić i sar, 2007). Endotelno zavisna vazorelaksacija izolovanih prstenova humane submandinularne arterije izazvana ACh posledica je oslobađanja NO i produkata ciklooksigenaze, a vazorelaksacija izazvana VIP rezultat je oslobađanja NO i endotelnog hiperpolarišućeg faktora (Stojić i sar, 2007). S druge strane, ispitujući efekte vazokonstriktornih molekula, Roganović i sar (2014) su u uslovima okluzije karotidne arterije na izolovanim prstenovima žlezdane grane facijalne arterije kunića pokazali da je vazokonstriktorni efekat norepinefrina veći, a potencirajući efekat NPY na vazokonstrikciju izazvanu norepinefrinom manji kada je endotel prisutan u odnosu na preparate facijalne arterije bez endotela. Time su autori pokazali da vazokonstriktorni efekti norepinefrina i NPY u uslovima akutne hipoksije zavise od prisustva endotela.

Vazokonstriktorni efekat Ang II ispitan je na različitim krvnim sudovima organizma, kako životinja, tako i čoveka (MaassenVanDenBrik i sar, 1999; Petrescu i sar, 2001; Ueda i sar, 2000). Međutim, podaci o efektu ovog autokoida na krvnim sudovima pljuvačnih žlezda potiču samo iz malobrojnih studija na animalnom modelu. Fazekas i sar (1991) su primenom laser doplera prvi put pokazali da Ang II nakon lokalne intraarterijske infuzije značajno smanjuje, za 29%, protok krvi kroz submandibularnu žlezdu pacova. Autori su pokazali i da ovaj efekat Ang II izostaje ukoliko se prethodno primeni saralazin (iv), blokator angiotenzinskih receptora. Na vazokonstriktorni efekat Ang II u submandibularnoj žlezdi pacova su indirektno ukazali Vag i sar (2002), ispitujući vaskularni otpor (metoda sa izotopom rubidijuma) posle primene kandesartana, blokatora AT₁ receptora. Autori su pokazali da kandesartan značajno smanjuje vaskularni otpor u submandibularnoj žlezdi.

1.2. Sastav i uloge pljuvačke

Pljuvačka predstavlja složeni i dinamični oralni fluid (ukupna, mešovita pljuvačka) koji sadrži mnoštvo komponenti poreklom, ne samo iz pljuvačnih žlezda, već i iz gingivalne tečnosti, orofaringsa, gornjih partija respiratornog trakta i hrane (Dodds i sar, 2005; Lima i sar, 2010).

Za ostvarivanje mnogobrojnih funkcija pljuvačke potrebno je da u usnoj duplji ona bude prisutna u dovoljnoj količini i adekvatnom sastavu. Ukupna količina izlučene pljuvačke iznosi 1-2L dnevno i može varirati u količini između različitih osoba, kao i tokom dana, prateći cirkadijalni ritam. Doprinos pljuvačnih žlezda ukupnoj količini izlučene pljuvačke je različit. Procentualno gledano 70% nestimulisane pljuvačke čini pljuvačka submandibularne pljuvačne žlezde, 21% parotidne, a 2% sublingvalne žlezde, dok je u sastavu nestimulisane pljuvačke zastupljeno 7% sekreta malih pljuvačnih žlezda (Aps i Martens, 2005). Ovaj odnos zastupljenosti pljuvačke pojedinih žlezda se menja u uslovima stimulacije kada najveći doprinos u ukupnoj količini pljuvačke ima pljuvačka parotidne pljuvačne žlezde (Navazesh i Kumar, 2008; Aps i Martens, 2005). Iako male pljuvačne žlezde imaju znatno manji udeo u formiranju ukupne količine pljuvačke od velikih, činjenica da zbog kontinuiranog lučenja tokom 24h održavaju vlažnost i integritet zaštitnog sloja koji oblaže oralnu sluzokožu ukazuje na njihov značaj (Navazesh i Kumar, 2008; Ekström i sar, 2012).

Takođe, kao što se doprinos ukupnoj količini pljuvačke razlikuje između pljuvačnih žlezda, postoje i razlike u sastavu pljuvačke koje zavise od tipa pljuvačne žlezde koja je sekretuje. Naime, tip izlučene pljuvačke zavisi od zastupljenosti seroznih odnosno mukoznih ćelija u acinusima pljuvačnih žlezda. Poznato je da su serozne ćelije bogate proteinskim granulama i odgovorne za sekreciju vode i enzima, dok mukozne ćelije sekretuju viskozne mucine skladištene u vakuolama (Ekström i sar, 2012). Tako, parotidna pljuvačna žlezda pripada seroznim žlezdama, submandibularna seromukoznim (90% serocita i 10% mukocita), a sublingvalna i male pljuvačne žlezde mukoznim žlezdama. Lingvalne pljuvačne žlezde (von Ebnerove žlezde) su, iako male, seroznog tipa.

Pljuvačku najvećim delom (99%) čini voda kao tečna komponenta, dok preostali deo čini čvrsta komponenta (neorganski i organski molekuli) koja je rastvorena u vodi. Neorganski molekuli uključeni u sastav pljuvačke su elektroliti od kojih su najznačajniji Na^+ , Cl^- , HCO_3^- (Lima i sar, 2010). Naime, poznato je da elektroliti utiču na čulo ukusa; koncentracije jona Na^+ i Cl^- predstavljaju donju granicu za osećaj slanog ukusa, dok HCO_3^- joni regulisanjem pH pljuvačke utiču na osećaj slatkog (Mese i Matsuo, 2007). Od ne manjeg značaja su i Ca^{2+} i fosfatni joni pljuvačke koji učestvuju u očuvanju integriteta tvrdih zubnih tkiva (Dawes, 2008; Dodds i sar, 2005).

Najvažniji organski molekuli pljuvačke su proteini (više od 400 tipova) koji mogu biti žlezdanog porekla (alfa-amilaza, histatini, cistatini, laktoferini, lizozimi, mucini i prolinom-bogati proteini) ili poreklom iz krvne plazme (albumini, sekretorni imunoglobulin A - sIgA, transferin) (Lima i sar, 2010). Salivarni proteini, između ostalog, zajedno učestvuju u sastavu pelikule, lokalizovane, kako na zubima, tako i na oralnoj sluzokoži, koja štiti oralna tkiva tako što formira fizičku barijeru, kontroliše adheziju patogenih mikroorganizama i učestvuje u lubrikaciji (Dawes, 2008; Hannig i sar, 2005; Gibbins i sar, 2014). Međutim, iako postoji sličnost u funkcijama zubne i mukozne pelikule prisutne su razlike u njihovom sastavu. Naime, Gibbins i sar (2014) su pokazali da, za razliku od zubne pelikule, mukozna ne sadrži prolinom-bogate proteine, a ni staterin.

Brojne funkcije pljuvačke mogu se podeliti u dve grupe: digestivne i zaštitne funkcije (Mandel, 1987). Digestivne funkcije uključuju ulogu pljuvačke u mehaničkoj obradi hrane: žvakanju, formiranju zalogaja i gutanju. Takođe, pljuvačka učestvuje u hemijskom varenju hrane zahvaljujući amilazi i lipazi, enzimima koji svoju funkciju ostvaruju i u želucu. Međutim, za razliku od amilaze koja deluje samo dok želudačna kiselina ne proдре u zalogaj, lipaza u želucu započinje varenje masti (Hamosh i Burns, 1977; Ekström i sar, 2012). Zahvaljujući rastvaranju supstancija iz hrane i obezbeđivanju njihovog kontakta sa gustativnim korpuskulima pljuvačka ostvaruje posredničku ulogu vezanu za čulo ukusa (Mese i Matsuo, 2007; Ekström i sar, 2012).

Zaštitne uloge pljuvačke, na prvom mestu, predstavlja lubrikacija koja se karakteriše kao sposobnost pljuvačke da smanji trenje između dodirnih površina u funkciji formirajući tanak film preko oralnih struktura sastavljen većim delom od mucina (Schipper i sar, 2007; van Nieuw Amerongen i sar, 2004). Formirani lubrikantni sloj olakšava govor i prolazak hrane u dalje partije gastrointestinalnog trakta (Mandel, 1987). Pljuvačka učestvuje i u zaštiti tvrdih zubih tkiva održavanjem pH usne duplje neutralnim, pomoću puferskih karakteristika bikarbonata, fosfata i proteina, kao i stimulacijom remineralizacije jonima kalcijuma (Dawes, 2008). Takođe, pljuvačka ima i antimikrobnu ulogu delujući baktericidno i bakteriostatski zahvaljujući raznim salivarnim proteinima (lizozim, laktoferin, laktoperoksidaze) (van Nieuw Amerongen i sar, 2004). Pored uticaja na bakterijsku oralnu floru, pljuvačka zahvaljujući sIgA obezbeđuje i imunološku zaštitu usne duplje od virusnih infekcija (Gibbins i sar, 2014).

Poznata je i uloga pljuvačke u zarastanju rana zahvaljujući faktorima rasta kao što je epidermalni i vaskularni endotelni faktor rasta (Ekström i sar, 2012; Keswani i sar, 2013). Značajno je istaći i da pljuvačka zadržava svoje zaštitne uloge nakon gutanja i tako učestvuje i u zaštiti gornjih partija gastrointestinalnog trakta (Brown i sar, 1995; Ekström i sar, 2012).

Mada je egzokrina funkcija pljuvačnih žlezda njihova najvažnija fiziološka aktivnost, poznato je da pljuvačne žlezde imaju i ekskretornu i moguću endokrinu funkciju (Ekström i sar, 2012). Utvrđeno je da se pojedini hormoni, kao što su melatonin, kortizol, polni hormoni, kao i brojni lekovi, pasivnom difuzijom iz cirkulacije izlučuju preko pljuvačnih žlezda u pljuvačku. Zahvaljujući ovoj ekskretornoj ulozi pljuvačka se danas koristi kao supstrat za praćenje fizioloških i terapijskih koncentracija hormona i lekova u organizmu, kao i za detekciju zloupotrebe lekova (Gröschl, 2009; Aps i Martens, 2005). S druge strane, uočeno je prisustvo nekih komponenti salivarnog porekla u krvi, kao što su amilaza i epidermalni faktor rasta, što ukazuje na potencijalnu endokrinu funkciju pljuvačnih žlezda (Isenman i sar, 1999).

1.3. Smanjen protok pljuvačke

Protok pljuvačke predstavlja meru aktivnosti pljuvačnih žlezda, kako u nestimulisanim, tako i u stimulisanim uslovima, i može se izraziti kao količina pljuvačke, ukupne ili poreklom iz pojedinačnih pljuvačnih žlezda, izlučene tokom određenog vremenskog perioda (ml/min) (Navazesh i sar, 1992; Navazesh i Christensen, 1982). Velike varijacije u okviru fizioloških vrednosti protoka pljuvačke otežavaju definisanje referentnih vrednosti neophodnih za utvrđivanje funkcije pljuvačnih žlezda u kliničkoj praksi (Thomson, 2005; Atkinson i sar, 2005). Normalan protok ukupne nestimulisane pljuvačke najčešće predstavljaju vrednosti veće 0,3 ml/min, a stimulisane vrednosti čak do 5 ml/min (Porter i sar, 2004; Dawes, 2008). Određivanje vrednosti protoka pljuvačke, kao i njegovog smanjenja, od značaja je za dijagnostiku oralnih oboljenja, kao i oralnih komplikacija nekih sistemskih oboljenja (Navazesh i Kumar, 2008; Närhi i sar, 1999; Turner i Ship, 2007). Najčešće na smanjeno lučenje pljuvačke (hiposalivacija) ukazuje protok ukupne nestimulisane pljuvačke manji od 0,1 ml/min, a stimulisane manji od 0,7 ml/min (Saleh i sar, 2015; Scully i Felix, 2005; Löfgren i sar, 2012). Postoji još jedan fenomen vezan za aktivnost

pljuvačnih žlezda – kserostomija, subjektivni osećaj suvoće usta, simptom smanjene funkcije pljuvačnih žlezda koji inače pacijenti prvi primete.

Smanjeno lučenje pljuvačke odgovorno je za narušavanje oralne homeostaze koje se manifestuje pojavom stomatodinije (osećaj pečenja usta), disgeuzije (poremećaj čula ukusa), disfagije (smatnje u žvakanju), kao i pojavom smetnji u govoru (Ship, 2002; Saleh i sar, 2015; Han i sar, 2015). Kod osoba sa smanjenjem protoka pljuvačke povećan je rizik od oštećenja tvrdih zubnih tkiva (erozije, demineralizacija), pojave zubnog karijesa, parodontalnih oboljenja, kao i intraoralnih infekcija, na primer oralne kandidijaze (Ship, 2002; Saleh i sar, 2015). Takođe, kod ovih osoba zabeležena je i slaba retencija zubnih nadoknada (Han i sar, 2015). Sve navedene posledice hiposalivacije značajno narušavaju, kako zdravlje pacijenta, tako i kvalitet života (Ikebe i sar, 2007; Mariño i sar, 2008).

Faktori od značaja za pojavu kserostomije i hiposalivacije su fiziološki (uzrast, pol) i patološki (bolesti, neželjeni efekti lekova) (Liu i sar, 2012; Nederfors, 2000). Najveći broj epidemioloških studija pokazuje da se kod odraslih osoba različite starosti kserostomija i hiposalivacija javljaju u različitom stepenu (Liu i sar, 2012; Ohara i sar, 2016; Nagler i Hershkovich, 2005; Murray Thomson i sar, 2006). Prevalenca kserostomije kod osoba starosti oko 30 godina iznosi 5%, dok kod osoba starijih od 65 godina varira između 11% i 72% sa značajnim povećanjem tokom daljeg života (Murray Thomson i sar, 2006; Närhi, 1994; Thomson i sar, 1999; Johansson i sar, 2012). Mnoge funkcionalne studije su pokazale da sa starenjem ne dolazi do smanjenja funkcije pljuvačnih žlezda, međutim, postoje i studije koje su pokazale suprotno (Heft i Baum, 1984; Ben-Aryeh i sar, 1984; Nagler, 2004; Percival i sar, 1994; Navazesh i sar, 1992). Na primer, Heft i Baum (1984) su u populaciji od 85 zdravih ispitanika starosti od 23 do 81 godine pokazali da se protok parotidne pljuvačne žlezde, kako u nestimulisanim, tako i u stimulisanim uslovima, ne menja sa starenjem. Ben-Aryeh i sar (1984) su, međutim, pokazali da se protok ukupne stimulisane pljuvačke ne menja sa starenjem, za razliku od protoka ukupne nestimulisane pljuvačke koji se značajno redukuje. Nagler i Hershkovich (2005) su u komparativnoj studiji pokazali značajno smanjenje protoka ukupne nestimulisane pljuvačke, čak 62%, kod osoba starijih od 60 godina ($0,16 \pm 0,04$ ml/min), u odnosu na mlade osobe starosti oko 20 godina ($0,42 \pm 0,05$ ml/min). Iako je poznato da se sa starenjem smanjuje sekretorni kapacitet pljuvačnih

žlezda usled smanjenja broja funkcionalnih acinusnih ćelija to ne mora biti osnovni razlog za pojavu hiposalivacije, jer je pokazano da s godinama pljuvačne žlezde postaju osetljivije na dejstvo egzogenih faktora kao što su bolesti i lekovi (Vissink i sar, 1996; Ship i sar, 2002; Närhi i sar, 1992; Smidt i sar, 2011).

Polne razlike u protoku pljuvačke uglavnom su posledica uticaja estrogena na sekretornu funkciju pljuvačnih žlezda (Meurman i sar, 2009). Kod žena periodi sa povećanom koncentracijom estrogena u cirkulaciji, kao što su pubertet i trudnoća, praćeni su pojačanom salivacijom, dok je period menopauze sa smanjenim nivoom estrogena praćen različitim stepenima kserostomije i hiposalivacije (Yalcin i sar, 2005; Agha-Hosseini i sar, 2009; Minicucci i sar, 2013). Takođe, Inoue i sar (2006) su pokazali da i veličina pljuvačnih žlezda može značajno doprineti polnim razlikama u lučenju pljuvačke. Poredeći protok ukupne nestimulisane pljuvačke, veličine pljuvačnih žlezda (parotidna i submandibularna) i telesnog profila (visina, težina, indeks telesne mase) kod zdravih odraslih osoba oba pola starosti 20-32 godina, autori su pokazali da je kod žena u odnosu na muškarce protok pljuvačke niži zbog manje veličine pljuvačnih žlezda koja je u korelaciji sa manjom telesnom masom.

Najčešća oboljenja koja dovode do nastanka kserostomije /hiposalivacije su oboljenja samih pljuvačnih žlezda, kao što su Sjogrenov sindrom i sarkoidoza, infekcije pljuvačnih žlezda izazvane virusima (HCV, HIV, EBV) (Porter i sar, 2004; Saleh i sar, 2015; Gonzalez i sar, 2014). Povrede glave i vrata praćene povredama nerava koji kontrolišu lučenje pljuvačke i vrlo često terapijski postupak kao što je radioterapija u predelu glave i vrata dovode do dugotrajne kserostomije (Porter i sar, 2004; Atkinson i sar, 2005; Jensen i sar, 2010). Sistemska oboljenja kao što su dijabetes melitus (DM) tip 1 i 2, i dijabetes insipidus, značajno doprinose smanjenju lučenja pljuvačke i povećanju kserostomije (Porter i sar, 2004; Sandberg i sar, 2000; Moore i sar, 2001).

Pojava kserostomije je danas povezana sa primenom više od 500 lekova i lekovi predstavljaju najčešći uzrok hiposalivacije (Porter i sar, 2004; Scully i Bagan, 2004; Navazesh i sar, 1996). Lekovima izazvane kserostomija i hiposalivacija najčešće se viđaju kod starijih osoba zbog istovremenog uzimanja više lekova (Scully, 2003; Atkinson i sar, 2005). Najčešći lekovi za koje je pokazano da imaju ove neželjene efekte su: triciklični antidepresivi, antipsihotici, antimuskarinici, diuretici, antihipertenzivi i

benzodiazepini, mada su dokazi u vidu dobro kontrolisanih studija za sada malobrojni (Scully, 2003; Porter i sar, 2004; Scully i Bagan, 2004).

U velikoj studiji ispitivanja etioloških faktora važnih za pojavu hiposalivacije i kserostomije Bergdahl i Bergdahl (2000) su ispitivali uticaj lekova, psihološkog statusa (anksioznost i depresija) i stresa na protok ukupne nestimulisane pljuvačke i kserostomiju u populaciji ispitanika oba pola starosti od 20 do 69 godina. Autori su pokazali da godine i lekovi u većem stepenu izazivaju hiposalivaciju, dok na pojavu kserostomije veći uticaj imaju pol (ženski) i psihološki status.

1.4. Antioksidativni potencijal pljuvačke

Pljuvačka predstavlja prvu liniju odbrane od oksidativnog stresa zahvaljujući svom antioksidativnom potencijalu (Battino i sar, 2002). Oksidativni stres nastaje usled poremećaja fiziološke ravnoteže između visoko reaktivnih slobodnih radikala i antioksidativnog sistema (Sies, 1997). Poremećaj ravnoteže je posledica povećane produkcije slobodnih radikala i/ili smanjene aktivnosti antioksidativnog sistema (Sies, 1997). Slobodni radikali mogu biti kiseonični: superoksidni anjon, vodonik peroksid, hidroksilni radikal, ili azotni: peroksinitrit, NO, azot dioksid, na primer (Kesarwala i sar, 2016). U visokim koncentracijama oni pokazuju citotoksične efekte usled oksidacije lipida (lipidna peroksidacija), proteina i DNK, koji dovode do ćelijskih oštećenja (Valko i sar, 2007). Ovi efekti su uključeni u patogenezu, kako brojnih sistemskih oboljenja (kardiovaskularne bolesti, neoplazme, DM), tako i oboljenja nastalih kao posledica poremećene oralne homeostaze (parodontopatija) (Miricescu i sar, 2011; Kesarwala i sar, 2014). Poslednjih godina sve veći broj studija pokazuje da upravo oksidativni stres povezuje sistemska i oralna oboljenja (Miricescu i sar, 2011).

Lipidna peroksidacija predstavlja proces oksidativnog oštećenja lipida koji započinje na nivou ćelijskih membrana koje su najvećim delom izgrađene od fosfolipida (Halliwell i Chirico, 1993). Jedan od proizvoda lipidne peroksidacije je malondialdehid (MDA) koji predstavlja biomarker oksidativnog stresa (Janero, 1990). Usled svoje visoke reaktivnosti koje pokazuje prema proteinima i nukleinskim kiselinama, MDA je toksičan, potencijalno mutagen i aterogen molekul (Hyvarinen i sar, 2014; Ottener i sar, 2006; Riggins i sar, 2004). Poznato je da promene u koncentraciji MDA u organizmu odražavaju prisustvo patoloških procesa koji se javljaju u brojnim

oboljenjima, kao što su kardiovaskularna oboljenja, dijabetes melitus, kancer, kao i sa starenjem (Jain i sar, 2000; Dilliogluligil i sar, 2012; Boaz i sar, 1999; Weismann i sar, 2011). Povećane koncentracije MDA zabeležene su i u oralnim manifestacijama sistemskih oboljenja (dijabetes melitus i lihen planus), kao i u oralnim oboljenjima (periodontitis, leukoplakija, oralna submukozna fibroza, oralni kancer) (Rai i sar, 2006; Guentsch i sar, 2008; Al-Rawi, 2011; Agha-Hosseini i sar, 2009).

Antioksidativnu odbranu čini sistem komponenti koje značajno odlažu ili inhibišu štetni efekat oksidacije, a sastoji se iz enzimskih i neenzimskih komponenti (Halliwell, 1997; Valko i sar, 2007). Enzimske komponente antioksidativnog sistema predstavljaju superoksid dizmutaza (SOD), katalaza, glutation peroksidaza, dok su neenzimske glutation, vitamin C i E, melatonin, mokraćna kiselina. Ovaj sistem je prisutan u svim telesnim tečnostima i tkivima, i u njegovom održavanju centralnu ulogu ima krv koja transportuje i vrši preraspodelu antioksidanata u telu (Halliwell i Cross, 1994; Ghiselli i sar, 2000). U fiziološkim uslovima ravnoteža koja postoji između aktivnosti i intraćelijskih nivoa ovih antioksidanasa je od velikog značaja za očuvanje zdravlja uopšte (Valko i sar, 2007).

Pljuvačka sadrži bogat antioksidativni sistem sa značajnom ulogom u zaštiti usne duplje, kao i gastrointestinalnog trakta, od oksidativnog stresa, s obzirom da su procesi mastikacije i početne faze varenja hrane u ustima praćeni brojnim reakcijama oksidacije, uključujući i lipidnu peroksidaciju (Battino i sar, 2002; Nagler i sar, 2003; Terao i Nagao, 1991). U okviru enzimskih komponenti salivarnog antioksidativnog sistema značajnu odbranu od slobodnih kiseoničnih radikala predstavlja SOD koja katalizuje razgradnju superoksidnih anjona na vodonik peroksid i molekularni kiseonik (Iannitti i sar, 2012; Battino i sar, 2002). S druge strane, jedna od značajnih neenzimskih komponenti antioksidativnog sistema pljuvačke je glutation, snažno redukciono sredstvo koje učestvuje u detoksikaciji slobodnih kiseoničnih radikala (Iannitti i sar, 2012; Townsend i sar, 2003). Pokazano je da je povećana osetljivost periodontalnih tkiva na oksidativni stres praćena smanjenom količinom salivarnog redukovanog glutaciona kod pacijenata sa DM tip 1 (Gümüş i sar, 2009).

Antioksidativnom potencijalu pljuvačke značajno doprinosi i mokraćna kiselina koja je u pljuvački prisutna u sličnim koncentracijama kao u serumu (Moore i sar, 1994). Drugi antioksidansi, kao što su vitamin C i albumini, su takođe prisutni, ali u

nižim koncentracijama nego u serumu (Moore i sar, 1994). Odnos količina vitamina C i albumina u krvi i pljuvački ukazuje više na aktivnu sekreciju ovih salivarnih antioksidanata, a manje na pasivnu difuziju iz cirkulacije (Sculley i Langley-Evans, 2002).

Razlike u koncentracijama antioksidanasa se uočavaju i između ukupne stimuliisane i nestimulisane pljuvačke. Ukupna stimuliisana pljuvačka sadrži niži totalni antioksidativni kapacitet od nestimulisane, ali kada se protok pljuvačke uzme u obzir antioksidativni potencijal stimuliisane pljuvačke je veći nego nestimulisane, tako da bi se odredio ukupni antioksidativni kapacitet prisutan u usnoj duplji pored izmerene koncentracije salivarnih antioksidanasa treba uzeti u obzir i količinu izlučene pljuvačke (Moore i sar, 1994; Nagler i sar, 2003).

Karakterizacija antioksidantnog profila pljuvačke velikih pljuvačnih žlezda pokazuje zavisnost koncentracije salivarnih antioksidanasa od vrste žlezda. Nagler i sar (2002) su pokazali da su koncentracije salivarnih neenzimskih i enzimskih komponenti (mokraćna kiselina, SOD, peroksidaza) veće u parotidnoj nego u submandibularnoj-sublingvalnoj pljuvački, kako u nestimulisanim, tako i u stimulisanim uslovima.

Značajno je istaći i da koncentracije salivarnih antioksidanasa pokazuju dnevne varijacije, kao i da zavise od uzrasta ispitanika. Na primer, Borisenkov i sar (2007) su ustanovili da totalni antioksidativni kapacitet pljuvačke, indikator ukupne antioksidativne zaštite, pokazuje cirkadijalne varijacije tokom dana sa maksimalnim koncentracijama u 6h pre podne i minimalnim u 3h posle podne. Što se tiče uticaja uzrasta na salivarni antioksidativni potencijal, Hershkovich i sar (2007) su pokazali da je ukupni oralni antioksidativni kapacitet značajno manji kod starijih osoba u odnosu na mlade. S druge strane, Celecová i sar (2013) su pokazali da postoji pozitivna korelacija između totalnog antioksidativnog kapaciteta u pljuvački i godina starosti, što je u suprotnosti sa nalazima Hershkovich i sar (2007). Međutim, treba uzeti u obzir da su ove dve istraživačke grupe primenjivale različite metode za određivanje salivarnog antioksidativnog kapaciteta koje mogu doprineti pojavi različitih rezultata.

Poznato je da na salivarni antioksidativni sistem utiču, kako oralna, tako i sistemska oboljenja. Brojne studije pokazuju da je parodontopatija praćena smanjenjem antioksidativnog potencijala pljuvačke koji nije u mogućnosti da neutrališe visoke koncentracije slobodnih radikala koje prate ovo oboljenje (Chapple i sar, 1997; Sculley i

Langly-Evans, 2003; Diab-Ladki i sar, 2003). Zatim, pokazano je da se sa povećanjem aktivnosti zubnog karijesa povećava i salivarni totalni antioksidativni kapacitet, najverovatnije zbog povećanja koncentracije ukupnih proteina pljuvačke koji značajno doprinose njenom antioksidativnom potencijalu (Tulunoglu i sar, 2006; Preethi i sar, 2010; Ahmadi-Motamayel i sar, 2013). Takođe, pokazano je povećanje markera lipidne peroksidacije praćeno smanjenjem totalnog antioksidativnog kapaciteta i ekspresije SOD u pljuvački pacijenata sa oralnim premalignim lezijama, kao što su lekoplakija, lihen planus i eritroplakija (Vlkova i sar, 2012). S druge strane, reumatoidni artritis, sistemska skleroza i DM su sistemska oboljenja praćena bilo povećanjem bilo smanjenjem komponenti salivarnog antioksidativnog sistema (Nagler i sar, 2003; Zalewska i sar, 2014; Reznick i sar, 2006). Smatra se da ove promene salivarnog antioksidativnog sistema mogu biti od značaja za dijagnozu pomenutih sistemskih oboljenja. Takođe, postojanje korelacije između parametara salivarnog antioksidativnog sistema i stepena patoloških promena u tkivima tokom sistemskih oboljenja ukazuju i na mogućnost da se analiza salivarnih antioksidanata koristi kao metoda za praćenje razvoja ovih oboljenja (Nagler i sar, 2003; Reznick i sar, 2006).

2. ANGIOTENZINSKI SISTEM

2.1. Komponente angiotenzinskog sistema

Renin-angiotenzinski sistem (RAS) kao kaskada započinje biosintezom renina, proteolitičkog enzima poreklom iz jukstaglomerularnih ćelija bubrega (modifikovane glatke mišićne ćelije lokalizovane u zidu aferentne arteriole), kao odgovor na nizak perfuzioni pritisak u bubrezima, pad koncentracije natrijuma u predelu *macule dense* ili povećanje aktivnosti simpatikusa (Atlas, 2007). Renin se zatim oslobađa u cirkulaciju gde deluje na angiotenzinogen, cirkulišući α_2 -globulin koji se sintetise u jetri, i formira Ang I, dekapeptid. Od Ang I, pod dejstvom ACE, koji se većim delom nalazi u endotelu krvnih sudova pluća, nastaje Ang II, oktapeptid (Atlas, 2007). U sintezi Ang II, osim ACE, učestvuju i drugi enzimi kao što su himaza, katepsin G, tonin, aktivator tkivnog plazminogena (Belova, 2000). Ang II se pod dejstvom ACE2, enzima koji je homolog ACE, lokalizovanog većinom u endotelnim ćelijama krvnih sudova, konvertuje u Ang (1-7), heptapeptid (Lambert i sar, 2008). Takođe, na Ang II mogu delovati i neke aminopeptidaze koje dovode do nastanka Ang III (heptapeptid) i Ang IV (heksapeptid) (Touyz i Schiffrin, 2000). Imajući u vidu da najveći deo RAS, počevši od angiotenzinogena, čine elementi angiotenzinskog sistema, vrlo često se danas u literaturi taj deo sistema analizira samostalno kao angiotenzinski sistem.

Glavni biološki aktivni peptid angiotenzinskog sistema je Ang II za čiju sintezu je primarno odgovoran ACE, cink-metaloproteinaza (Coates, 2003). Kod kičmenjaka, ACE je prisutan su dve izoforme, somatskoj (sACE) i germinalnoj (gACE), a gen za njihovu sintezu se nalazi na hromozomu 17 (Coates, 2003; Turner i Hooper, 2002). sACE je lokalizovana na površini endotelnih i epitelnih ćelija u mnogim tkivima, dok je gACE prisutna u muškim gonadama i učestvuje u održavanju fertiliteta (Turner i Hooper, 2002). Obe izoforme pripadaju transmembranskim glikoproteinima tip 1 sa ekstracelularnim amino krajem i kratkim intraćelijskim citoplazmatskim repom (Lambert i sar, 2010). Međutim, sACE je prisutna i u obliku solubilnog enzima (kome nedostaje transmembranski i citosolni domen) u plazmi i drugim telesnim tečnostima (Das i sar, 1977). Razlika između izoformi ogleda se i u broju aktivnih mesta; sACE poseduje dva katalitička mesta, dok gACE samo jedno (Coates, 2003). Glavna fiziološka funkcija sACE je u kardiovaskularnoj homeostazi. sACE hidrolizuje dipeptid

sa C-terminalnog kraja Ang I usled čega nastaje snažan vazokonstriktor, Ang II (Coates, 2003). ACE učestvuje i u metabolizmu vazodilatatora bradikina, hidrolizujući dipeptid sa C-terminalnog kraja, kao i u degradaciji vazodilatatora Ang (1-7), na inaktivni peptid kao što je Ang (1-5) (Coates, 2003; Velez i sar, 2012).

Ang II ostvaruje svoje efekte preko AT₁ i AT₂ transmembranskih receptora udruženih sa G proteinom koji se sastoje iz ekstraćeliskog, membranskog i citosolnog regiona (de Gasparo i sar, 2000). Humani AT₁ receptor se sastoji od 359 aminokiselina, a gen za njegovu sintezu se nalazi na hromozomu 3, dok se AT₂ receptor sastoji od 363 aminokiseline čiji se gen nalazi na hromozomu X (de Gasparo i sar, 2000).

Većinu fizioloških efekata Ang II ostvaruje preko AT₁ receptora lokalizovanih u CNS, nadbubrežnoj žlezdi, srcu, krvnim sudovima i bubrezima (Dinh i sar, 2001). Ang II se N-terminalnim krajem primarno vezuje za ekstraćelijski region receptora, i to za prvu i treću ekstraćelijsku omču. Ostali strukturni delovi Ang II se vezuju za membranski deo receptora, kao i za intraćelijski deo. Veza Ang II i membranskog dela receptora učestvuje u stabilizaciji konformacije receptora, dok veza intraćelijskog dela receptora sa središnjim delom i C-terminalnom fenilnom grupom Ang II započinje konformacione promene koje vode do aktivacije receptora. Konformaciona promena receptora promoviše njegovu interakciju sa G proteinom koji započinje transdukcioni signal preko više plazmamembranskih efektornih sistema (de Gasparo i sar, 2000). Transdukcioni signali AT₁ receptora uključuju aktivaciju fosfolipaza C, D i A₂ i voltažno zavisnih jonskih kanala za kalcijum L i T tipa, kao i inhibiciju adenil ciklaze (de Gasparo i sar, 2000). Takođe, aktivacija ovih receptora dovodi do fosforilacije tirozina i aktivacije fosfolipaze C- γ uključenih u aktivaciju proteina kao što su mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK), Janus kinaze (JAK) i proteini signali transdjuseri i aktivatori transkripcije (STAT) (Dinh i sar, 2001; de Gasparo i sar, 2000).

Efekti aktivacije AT₁ receptora posredstvom Ang II su kontrakcija glatkih mišića, oslobađanje prostaglandina, sekrecija aldosterona, stimulacija rasta i proliferacije ćelija (Dinh i sar, 2001; de Gasparo i sar, 2000). Ang II je i snažan medijator oksidativnog stresa (Mollnau i sar, 2002). Fosforilacija tirozina pod dejstvom Ang II, transdukcioni signal AT₁ receptora, aktivira NADPH oksidazu, membranski enzim koji predstavlja glavni izvor vaskularnih reaktivnih kiseoničnih slobodnih radikala (Higuchi i sar, 2007; Garrido i Griendling, 2009). Iako se Ang II u krvnim

sudovima primarno vezuje za glatke mišićne ćelije, on može uticati na endotelne ćelije gde reguliše ravnotežu između NO i slobodnih radikala, i održava homeostazu vaskularnog zida (Mollnau i sar, 2002; Nguyen Dinh Cat i Touyz, 2011; Garrido i Griendling, 2009).

AT₂ receptori pokazuju oko 34% sličnosti sa AT₁ receptorom (de Gasparo i sar, 2000). Homologija između receptora je uglavnom lokalizovana u transmembranskim hidrofobnim domenima za koje se smatra da su važni za vezivanje Ang II za receptore (de Gasparo i sar, 2000). Od AT₁ receptora AT₂ receptor se značajno razlikuje u lokalizaciji i signalnim mehanizmima. AT₂ receptori su tokom fetalnog razvoja prisutni u velikoj gustini, da bi njihov broj opadao nakon rođenja u većini tkiva (de Gasparo i sar, 2000). U tkivima odraslih prisutan je u mozgu, srcu, bubrezima, vaskularnom tkivu, koži i nadbubrežnoj žlezdi (de Gasparo i sar, 2000). Međutim, broj AT₂ receptora se povećava u patološkim stanjima kod odraslih (de Gasparo i sar, 2000). Signalni putevi nakon aktivacije AT₂ receptora uključuju aktivaciju serin/treonin i tirozin fosfataze, fosfolipaze A₂, stvaranje NO i cikličnog guanozin monofosfata (cGMP) (Dinh i sar, 2001). Iako funkcija ovih receptora još uvek nije potpuno razjašnjena, poznato je da se značajno funkcionalno razlikuju od AT₁ receptora. Poznati efekti aktivacije AT₂ receptora su vazodilatacija, antiproliferativni efekat, diferencijacija ćelija, regeneracija nerava i apoptoza (de Gasparo i sar, 2000).

Poznato je da pored klasične kaskade ACE/AngII/AT₁ receptor, angiotenzinski sistem ima i kaskadu sastavljenu od ACE2, Ang (1-7), i Mas receptora, koja pokazuje suprotne efekte od klasične. Tako ukupni efekti angiotenzinskog sistema zavise od balansa između aktivnosti ACE i ACE2 (Iwai i Horiuchi, 2009; Santos i sar, 2008).

Relativno skorašnja identifikacija ACE2 pružila je nove značajne informacije u vezi metabolizma angiotenzina i regulacije angiotenzinskog sistema (Tipnis i sar, 2000; Donoghue i sar, 2000). ACE2, kao i ACE, pripada grupi cink-metalopeptidaza i pokazuje približno 42% sličnosti sa ACE, i to u katalitičkom domenu. Međutim, za razliku od sACE, ACE2 sadrži samo jedno katalitičko mesto i deluje kao karboksimo-peptidaza hidrolizujući amino kiselinu sa C-terminalnog kraja supstrata. Zahvaljujući svojim različitim katalitičkim karakteristikama u odnosu na ACE, ACE2 pokazuje afinitet prema drugačijim supstratima i profilima inhibitora (Lambert i sar,

2010). Iako oba enzima imaju sposobnost da hidrolizuju Ang I, kinetika ovog procesa u odnosu na ACE2 (čiji je rezultat Ang (1-9)) nije primarna, što ukazuje da ACE2 ima manji afinitet za vezivanje sa Ang I nego ACE (Rice i sar, 2004). Takođe, ACE2 učestvuje u konverziji Ang II u Ang (1-7) (Lambert i sar, 2010). ACE2, kao i ACE, je lokalizovan u velikom broju tkiva kod životinja, međutim, kod ljudi je pronađen u visokim koncentracijama samo u srcu, bubregu i testisima (Gembardt i sar, 2005; Tipnis i sar, 2000). Pored efekata na Ang II, ACE2 vrši hidrolizu i drugih peptida van angiotenzinskog sistema čija je uloga takođe značajna u održavanju kardiovaskularne homeostaze, kao što je [des-Arg9] bradikinin (Turner i Hooper, 2002). [Des-Arg9] bradikinin je član kinin-kalikrein sistema koji nastaje aktivnošću karboksipeptidaze iz bradikinina i agonista je B₁ receptora koji se aktiviraju u tkivnom oštećenju (Kakoki i sar, 2007). Međutim, kako bi se utvrdio značaj ove degradacije [des-Arg9] bradikinina potrebna su dalja istraživanja (Lambert i sar, 2008). Što se tiče funkcije, ACE2 je uključen u kardiovaskularnu i bubrežnu homeostazu, patogenezu DM i gojaznosti, i služi kao receptor za virus koji izaziva teški akutni respiratorni sindrom (SARS) (Guy i sar, 2005).

Ang (1-7), najvažniji proizvod aktivnosti ACE2, može nastati i na druge načine: direktno iz Ang I pod dejstvom enzima neprilisin (neuralna endopeptidaza 24.11) i iz Ang (1-9), koji se pod dejstvom ACE konvertuje u Ang (1-7) (Welches i sar, 1993; Bader, 2013). Ovaj peptid ostvaruje svoje efekte preko Mas receptora, primarno otkrivenog kao protoonkogen (Bader, 2013; Metzger i sar, 1995). Ovaj receptor je predominantno eksprimiran u mozgu i testisima, ali je prisutan i u bubregu, srcu i krvnim sudovima (Metzger i sar, 1995). Mas receptor pripada receptorima udruženim sa G proteinom o čijem se transdukcijom signalnom putu još uvek ne zna sve. Ono što je poznato to je da signal čine oslobađanje arahidonske kiseline i intraćelijska fosforilacija Akt (protein kinaza B) (Sampaio i sar, 2007; Santos i sar, 2003; Verano-Braga i sar, 2012). S druge strane, podaci da Ang (1-7) u suprafiziološkim koncentracijama aktivira AT₁ receptore, ukazuju da Mas receptori nisu jedini receptori čiji je agonist Ang (1-7) (Bader, 2013).

Efekti Ang (1-7) su vazodilatacija, antitrombotični i antiproliferativni (Kucharewicz i sar, 2002; Langeveld i sar, 2005; Lavrentyev i Malik, 2009). Većina

ovih efekata je vezana za promene u redoks homeostazi vaskularnog zida (Xu i sar, 2008). Intraćelijskom fosforilacijom Akt Ang (1-7) aktivira eNOS, što je praćeno povećanjem NO koji inhibiše stvaranje slobodnih radikala u endotelnim ćelijama (Sampaio i sar, 2007; Sampaio i sar, 2007). U bubrezima Ang (1-7) utiče na regulaciju natrijuma smanjujući diurezu kod niske koncentracije, a pojačavajući kod povećane koncentracije ovog jona (Ferrario i Varagic, 2010). U srcu Ang (1-7) pokazuje kardioprotektivne efekte oslobađajući NO i delujući na kardiomiocite antioksidantno i antihipertrofično, međutim, glavni efekat Ang (1-7) u srcu predstavlja regulacija gena uključenih u fibrozu kardijalnih fibroblasta preko Mas receptora (Dias-Peixoto i sar, 2008; Gava i sar, 2012; Gomes i sar, 2010; Iwata i sar, 2005; Patel i sar, 2012; Patel i sar, 2012).

Što se tiče Ang III i IV o njihovoj ulozi u kardiovaskularnoj homeostazi za sada ima malo podataka (de Gasparo i sar, 2000). Postojeće studije ukazuju da Ang III učestvuje u centralnoj regulaciji krvnog pritiska (Wright i Harding, 1997; Zini i sar, 1996). Za sada nije poznato preko kojih receptora Ang III ostvaruje taj efekat. Za Ang IV je pokazano da je agonist AT₄ receptora lokalizovanih u mozgu, u strukturama odgovornim za kognitivne, motorne i senzorne funkcije (de Gasparo i sar, 2000). AT₄ receptori su lokalizovani i u perifernim tkivima i to u bubrezima, srcu, slezini, prostati, nadbubregu i kolonu. Primarna funkcija AngIV/AT₄ sistema uključena je u postizanje memorije i sećanja, regulaciju krvnog pritiska, inhibiciju bubrežne tubularne reapsorpcije natrijuma i hipertrofiju srca. Međutim, za sada nema podataka o signalnim mehanizmima koji prate aktivaciju AT₄ receptora.

Imajući u vidu da su enzimi angiotenzinskog sistema uključeni i u metabolizam peptida kinin-kalikrein sistema, takođe regulatora kardiovaskularne funkcije, značajno je istaći i karakteristike ovog sistema. Bradikinin je najvažniji fiziološki aktivan peptid ovog sistema koji se sastoji od 9 aminokiselina i učestvuje u regulaciji vaskularnog tonusa, kao potentni vazodilatator i inhibitor ćelijskog rasta (Tom i sar, 2003). Ovaj peptid nastaje u tkivima iz kininogena pod dejstvom kalikreina direktno ili preko intermedijatora kalidina i zatim se oslobađa u cirkulaciju (Duncan i sar, 2000; Nolly i sar, 1992). *In vivo* se bradikinin brzo metaboliše (za manje od 0,5 min) pod dejstvom kinaza od kojih su najvažnije metalopeptidaze ACE i NEP, aminopeptidaze P i

karboksipeptidaze M i N (Cyr i sar, 2001; Dendorfer i sar, 1997; Kokkonen i sar, 2000). Bradikinin svoje efekte ostvaruje preko B₁ i B₂ receptora udruženih sa G proteinom (Marceau i sar, 1998). B₂ receptori su u fiziološkim uslovima prisutni u brojnim ćelijama, uključujući endotelne i glatke mišićne ćelije krvnih sudova i kardiomiocite (Raidoo i sar, 1997; Minshall i sar, 1995). Aktivacija endotelnih B₂ receptora praćena je vazodilatacijom usled oslobađanja NO, prostaciklina ili endotelnog hiperpolarizujućeg faktora; u glatkim mišićima krvnih sudova praćena je vazokonstrikcijom koja je posledica povećanja intraćelijskog kalcijuma (Dendorfer i sar, 2001; Gobeil i sar, 2002; Calixto i Medeiros, 1992). Takođe, aktivacija B₂ receptora povezana je sa antihipertrofičnim i/ili antiproliferativnim efektima kod kardiomiocita i fibroblasta (Ishigai i sar, 1997; McAllister i sar, 1993). Za razliku od B₂ receptora, B₁ receptori su u istim ćelijama, kao i B₂ receptori, eksprimirani gotovo isključivo u patološkim uslovima kao odgovor na zapaljenje, citokine ili tkivnu traumu (Marceau i sar, 1998). Naime, pokazano je da eksperimentalno izazvana hipertenzija prouzrokuje ushodnu regulaciju B₁ receptora, ali ne i B₂, u srcu i bubregu miševa, kao i da se u odsustvu B₂ receptora fiziološki inertni B₁ receptori aktiviraju i preuzimaju neke hemodinamske karakteristike B₂ receptora, kao što je vazodilatacija (Duka i sar, 2001). S tim u vezi, važno je spomenuti da bradikinin ima manji afinitet za B₁ nego za B₂ receptore, kao i da njegovi metaboliti mogu delovati kao endogeni agonisti B₁ receptora (Marceau i sar, 1998).

2.2. Odnos cirkulatornog i tkivnog angiotenzinskog sistema

Podela angiotenzinskog sistema (kao i renin-angiotenzin sistema) - cirkulatorni i tkivni, zasnovana je na pitanju gde se odigrava sinteza elemenata ovog sistema: lokalno u tkivima ili u tkiva dospevaju iz cirkulacije. Cirkulatorni angiotenzinski sistem je primarno endokrini sistem u okviru koga se sistemno, u cirkulaciji, ostvaruju efekti renina na sintezu angiotenzina. Ukratko, renin poreklom iz bubrega se oslobađa u plazmu gde konvertuje cirkulišući angiotenzinogen poreklom iz jetre u Ang I. Prolaskom kroz plućni krvotok, pod dejstvom ACE lokalizovanog na endotelnim ćelijama, Ang I se konvertuje u Ang II. Nastali Ang II arterijskim krvotokom dospeva do perifernih tkiva gde ostvaruje efekte preko svojih AT₁ i AT₂ receptora. Ovakav cirkulatorni angiotenzinski sistem, u okviru koga Ang II deluje kao hormon, ima važnu

ulogu u održavanju kardiovaskularne funkcije regulišući krvni pritisak i homeostazu tečnosti i elektrolita (Lambert i sar, 2010).

S druge strane, tkivni angiotenzinski sistem, često nazivan – sistem za lokalnu sintezu Ang II (Danser, 2003), ne sadrži sve komponente angiotenzinskog sistema: renin i angiotenzinogen, koje preuzima iz cirkulacije, dok sadrži ACE, Ang I i II, AT₁ i AT₂ receptore. Naime, nakon difuzije renina i angiotenzinogena iz plazme u tkivo, lokalno renin konvertuje angiotenzinogen u Ang I koji se dalje pod dejstvom tkivnog ACE konvertuje u Ang II. Lokalno nastali Ang II se zatim vezuje za svoje receptore prisutne u tkivu i ostvaruje svoja parakrina (dejstvo autokoida na okolne ćelije u tkivu gde nastaje) i autokrina dejstva (dejstvo autikoida na ćeliju koja ga je sintetisala). Samo u ograničenom broju tkiva (posebno u bubrezima) renin i/ili njegovi prekursori prorenin se stvaraju lokalno, stoga je omogućena lokalna sinteza Ang II pod dejstvom lokalno nastalog renina. Iako se i angiotenzinogen može stvarati lokalno u bubrezima njegova funkcionalna uloga nije od značaja imajući u vidu da nivoi Ang II u bubregu kod miševa sa mutiranim genom za bubrežni angiotenzinogen („knock-out“ životinje) isti kao kod onih bez mutacije (Matsusaka i sar, 2012). Tkivni angiotenzinski sistem, u okviru koga Ang II deluje kao autokoid, ima važnu ulogu u regulaciji vaskularnog tonusa i funkcije glavnih vitalnih organa, kao što su srce i bubrezi (Lambert i sar, 2010). Značaj nedostatka tkivnog Ang II se posebno vidi u prisustvu ACE inhibitora u okviru njihovih efekata koji ne učestvuju u regulaciji krvnog pritiska već imaju protektivni značaj (Danser, 2003).

Mnoge studije ukazuju da regulacija tkivnog angiotenzinskog sistema, zavisno od vrste tkiva, može da zavisi, ali i ne mora, od cirkulatornog angiotenzinskog sistema. Naime, Trolliet i sar (1992) su pokazali da je lokalna sinteza Ang II nezavisna od cirkulišućeg angiotenzinskog sistema prisutna u mozgu pacova. Naime, bilateralna nefrektomija dovodi do pada koncentracije Ang II u plazmi, ali se pri tome u mozgu ne menja lokalna sinteza Ang II ili se šta više povećava. U drugim organima, kao na primer srcu, prisutna je interakcija između cirkulišućeg i tkivnog angiotenzinskog sistema gde cirkulišući renin i angiotenzinogen preuzeti iz plazme učestvuju u lokalnoj sintezi angiotenzina (Campbell i sar, 1993). Funkcionalno, cirkulišući i tkivni angiotenzinski sistem se međusobno dopunjuju, te je adekvatna regulacija oba sistema važna za održavanje fizioloških funkcija mnogih organa. S jedne strane, cirkulišući

angiotenzinski sistem, posebno sekrecija renina u bubrežima, omogućava brži i efikasniji homeostatski odgovor na akutne promene u krvnom pritisku i homeostazi tečnosti i elektrolita, dok s druge strane, tkivni angiotenzinski sistem omogućuje subakutne i hronične lokalne promene regulišući vaskularni tonus, funkciju bubrega, srca, žlezda i digestivnih organa, uključujući i pljuvačne žlezde (Paul i sar, 2006).

Veliki broj studija pokazuje prisustvo tkivnog angiotenzinskog sistema u animalnim tkivima, dok je malo podataka o prisustvu ovog sistema u humanim tkivima (Mulrow, 1993; Ohkubo i sar, 1986; Rogerson i sar, 1992; Rogerson i sar, 1995; Urata i sar, 1990; Whiting i sar, 1991). Jedna takva studija Paul i sar (1993) predstavlja prvu sistemsku analizu ekspresije gena za renin, angiotenzinogen i ACE u humanim tkivima i pokazuje njihovu ekspresiju u bubregu, nadbubrežnoj žlezdi, organima kardiovaskularnog sistema (srce, vena safena, aorta), placenti i umbilikalnoj veni. Najmanja koncentracija iRNK renina zabeležena je u srcu, dok je u veni safeni bila 100 puta manja nego u bubregu. Što se tiče ekspresije ACE2, Harmer i sar (2002) su pokazali njegovu visoku ekspresiju u bubregu, kardiovaskularnim tkivima, kao i gastrointestinalnom traktu, posebno u delovima distalno od želuca (ileum, duodenum, jejunum, cekum i kolon).

2.3. Angiotenzinski sistem u pljuvačnim žlezdama

Prisustvo komponenti tkivnog angiotenzinskog sistema za sada je pokazano na animalnim pljuvačnim žlezdama, ali ne i na ljudskim. U submandibularnim pljuvačnim žlezdama pacova pokazano je prisustvo AT_1 receptora i odsustvo ekspresije iRNK za renin i angiotenzinogen (Paul i sar, 2006). Na prisustvo lokalnog angiotenzinskog sistema u submandibularnoj žlezdi pacova ukazali su Hayashi i sar (2000) na modelu hipertrofije submandibularne žlezde izazvane isoproterenolom, neselektivnim beta adrenergičkim agonistom. Naime, autori su utvrdili povećan nivo Ang II u hipertrofičnim žlezdama i da se ovo povećanje može otkloniti primenom ACE inhibitora.

Miševi predstavljaju jedinstven animalni model za koji je pokazano da se sinteza renina odvija u pljuvačnim žlezdama jer je pokazana ekspresija iRNK za renin, kao i za angiotenzinogen (Paul i sar, 2006). Bing i sar (1980) i Bing i Poulsen (1979) su pokazali da se u submandibularnoj žlezdi miša većina glandularnog renina nalazi u sekretornim

granulama tubularnih ćelija iz kojih se oslobađa u pljuvačku i krv posle stimulacije alfa adrenoceptora. Otklanjanjem submandibularne žlezde autori su pokazali da visoke količine renina nađene u tkivu žlezde i pljuvački imaju mali uticaj na bazalni nivo renina u plazmi.

2.4. Interakcija angiotenzinskog i NO sistema

Azot monoksid predstavlja parakrini signalni molekul koji učestvuje u fiziološkim i patološkim mehanizmima u kardiovaskularnom, nervnom i imunom sistemu (Atkan i sar, 2004). NO nastaje konverzijom L-arginina u L-citrulin pod dejstvom enzima NO sinteze (NOS) u prisustvu kiseonika i kofaktora - NADPH, flavin mononukleotid, flavin adenin dinukleotid, tetrahidrobiopterin i kalmomodulin (Knowles i Moncada, 1994). Poznate su tri izoforme NOS enzima, dve konstitutivne - neuralna (nNOS) i endotelna (eNOS), uvek prisutne u organizmu, i jedna inducibilna izoforma (iNOS) koja se pojavljuje isključivo u patološkim uslovima (Alderton i sar, 2001). nNOS i iNOS izoforme su solubilne, dok eNOS pripada membranski vezanim enzimima (Liu i sar, 1995). Aktivacija konstitutivnih izoformi je kalcijum-zavisna i praćena je stvaranjem niskih koncentracija NO koje se oslobađaju postepeno, dok rezultat kalcijum-nezavisne aktivnosti iNOS predstavlja produženo oslobađanje visokih koncentracija NO (Moncada i Higgs, 1993; Nathan, 1992).

NO sintetisan u endotelnim ćelijama krvnih sudova, kao rezultat aktivnosti eNOS, ima važnu ulogu u vaskularnoj homeostazi (Moncada i sar, 1991). Iz endotelnih ćelija NO se oslobađa kao odgovor na pritisak krvi prilikom prolaska kroz krvne sudove ili na supstance koje svoje efekte ostvaruju preko receptora, kao što su ACh, bradikinin ili serotonin (Boulanger i Lüscher, 1990). Iz endotela NO difunduje u glatke mišićne ćelije gde aktivira solubilnu guanil ciklazu, povećava nivo cikličnog guanozin monofosfata i sledstveno izaziva relaksaciju glatkih mišića krvnih sudova (Moncada i sar, 1991). NO takođe sprečava adheziju i migraciju leukocita, proliferaciju glatkih mišićnih ćelija, adheziju i agregaciju trombocita, kao i apoptozu i inflamaciju pokazujući sveukupan antiaterogeni i vaskuloprotektivni efekat (Wheatcroft i sar, 2003).

Endotel krvnih sudova kao glavni regulator vaskularne homeostaze i izvor mnogih biološki aktivnih molekula, održava ravnotežu između vazodilatacije i

vazokonstrikcije, inhibicije i stimulacije migracije i proliferacije glatkih mišićnih ćelija, fibrinolize i trombogeneze, prevencije i stimulacije adhezije i agregacije trombocita, kao i antioksidativnih i prooksidativnih procesa (de Gasparo, 2002; Félétou, 2011). Poremećaj ove strogo regulisane ravnoteže u korist vazokonstriktornih, proliferativnih, trombogenih i prooksidativnih molekula vodi ka endotelnoj disfunkciji čija je glavna odlika poremećaj u dostupnosti NO.

Jedan od najznačajnijih endogenih vazokonstriktora koji ima značajnu ulogu u endotelnoj disfunkciji je Ang II. U krvnim sudovima, kako u endotelu, tako i glatkim mišićima, postoji značajna funkcionalna interakcija između NO i Ang II pri čemu ove molekule deluju kao fiziološki antagonisti u mnogim vaskularnim funkcijama (vaskularni tonus, ćelijski rast, apoptoza) i inflamaciji. Ova funkcionalna interakcija je određena međusobnom regulacijom sinteze i signalnih puteva NO i Ang II na više nivoa (Yan i sar, 2003). Pokazano je da NO utiče na aktivnost ACE i ekspresiju angiotenzinskih receptora. Tako, na primer, NO donori morfolinosidnonimin i dietilenetriamin inhibišu aktivnost ACE *in vitro* na izolovanim prstenovima karotidne arterije pacova (Acermann i sar, 1998), dok dugotrajna primena inhibitora NOS (nitro-L-arginin metil ester – L-NAME) povećava aktivnost ACE u srcu i aorti pacova (Takemoto i sar, 1997). Takođe, pokazano je i da NO donor S-nitrozo acetil DL-penicilamin smanjuje ekspresiju gena za AT₁ receptore *in vitro* u kulturi glatkih mišićnih ćelija grudne aorte spontano hipertenzivnih pacova (Ichiki i sar, 1998). Što se tiče Ang II, poznato je da Ang II utiče na sintezu NO preko svojih receptora. Ang II preko AT₁ receptora brzo stimuliše oslobađanje NO aktivacijom Ca²⁺/kalmmodulin zavisne eNOS na kulturi goveđih endotelnih ćelija (Saito i sar, 1996). Međutim, Olson i sar (2004) su pokazali da Ang II preko AT₁ receptora utiče negativno na sintezu NO, dok preko AT₂ receptora stimuliše povećanje ekspresije iRNK i proteina eNOS i sledstvenu sintezu NO u plućnom endotelu u *in vitro* uslovima. Gohlke i sar (1998) su pokazali da Ang II u uslovima selektivne inhibicije AT₁ receptora losartanom, preko AT₂ receptora izaziva bradikinin-zavisnu stimulaciju sinteze NO u aorti pacova. Pokazano je i da infuzija Ang II povećava nivoe eNOS iRNK i proteina, ali smanjuje sintezu NO u aorti pacova, najverovatnije usled disfunkcije eNOS koja je praćena pre produkcijom superoksida, nego NO (Mollnau i sar, 2002).

Pored Ang II u interakciji sa NO učestvuje i drugi efektorni peptid angiotenzinskog sistema, Ang (1-7). Naime, pokazano je da Ang (1-7), najverovatnije uz značajno učešće bradikina, stimuliše oslobađanje NO koje je praćeno oslobađanjem i niskih koncentracija superoksida iz endotelnih ćelija (bovine) u *in vitro* uslovima (Heitsch i sar, 2001). Takođe, Sampaio i sar (2007) su pokazali da Ang (1-7) aktivirajući Mas receptore stimuliše aktivnost eNOS i sintezu NO preko Akt-zavisnog puta u humanim endotelnim ćelijama aorte u *in vitro* uslovima.

NO predstavlja važnu signalnu molekulu na nivou pljuvačnih žlezda i pljuvačke. NO je prisutan i u humanoj pljuvački i potiče iz samih pljuvačnih žlezda (Looms i sar, 2002). U velikim i malim humanim pljuvačnim žlezdama prisutne su sve izoforme NOS enzima. nNOS se nalazi u nervnim vlaknima i epitelnim ćelijama izvodnih kanala pljuvačnih žlezda, eNOS u vaskularnom endotelu i epitelnim ćelijama izvodnih kanala, dok je iNOS lokalizovana isključivo u delovima pljuvačnih žlezda sa inflamacijom, ali ne i u zdravom tkivu (Soinila i sar, 2006). U pljuvačnim žlezdama NO učestvuje u regulaciji lučenja pljuvačke, dotoka krvi u žlezde, neurotransmisiji, odbrani od mikroorganizama, rastu i diferencijaciji ćelija (Looms i sar, 2002). Na interakciju između angiotenzinskog i NO sistema na nivou pljuvačnih žlezda ukazali su Vag i sar (2002) ispitujući vaskularni otpor u submandibularnoj pljuvačnoj žlezdi pacova. Pokazano je da se posle primene kandesartana (iv), selektivnog blokatora AT₁ receptora, javlja vazodilatacija krvnih sudova submandibularne žlezde, dok se vazokonstrikcija javlja ukoliko se posle kandesartana primeni L-NAME, neselektivni inhibitor NOS. Autori su zaključili da vazodilatacija u submandibularnoj pljuvačnoj žlezdi nastala blokadom AT₁ receptora je rezultat delovanja povećanog NO.

3. ACE INHIBITORI

ACE inhibitori su lekovi koji inhibišu sintezu Ang II i pripadaju lekovima prvog izbora za terapiju cirkulatornih i metaboličkih disfunkcija, uključujući hipertenziju i dijabetes melitus. S druge strane, dejstvo ACE inhibitora da povećavaju raspoloživost NO i sledstveno smanjenje rizika od oksidativnog stresa je jedan od značajnih farmakoloških mehanizama koji leže u osnovi njihovog protektivnog dejstva.

3.1. Klasifikacija i farmakokinetika ACE inhibitora

Danas grupu ACE inhibitora čini više od 12 lekova. Strukturno molekul ovih lekova čine funkcionalne grupe koje su odgovorne za njihovo vezivanje za ACE (cink-komponentu aktivnog mesta) i 2-metil-propranolol-L-prolin, deo molekula odgovoran za farmakodinamska svojstva (Williams, 1988). U odnosu na tip funkcionalne grupe u molekulu, ACE inhibitori su klasifikovani u tri grupe. ACE inhibitori koji sadrže sulfhidrilnu grupu su kaptopril, fentiapril, pivalopril, zofenopril i alacepril. Jedini ACE inhibitor sa fosfinil grupom je fosinopril, dok ACE inhibitore koji sadrže kardoksilnu grupu čine enalapril, lisinopril, perindopril, imidapril, benazepril, kvinapril, ramipril, trandolapril i moeksipril (Brown i Vaughan, 1998).

Farmakokinetičke karakteristike enalapрила su sledeće (Hockings i sar, 1986). Enalapril je prolek koji se posle oralne primene konvertuje u jetri u aktivan oblik, enalaprilat. Apsolutna bioiskoristljivost enalapрила, posle oralne primene, iznosi oko 60% i ne menja se sa starenjem. Maksimalna koncentracija enalapрила u plazmi (C_{max}) se postiže za 1 sat, a enalaprilata za oko 4 sata. Volumen distribucije enalaprilata je oko 12L. Oko 50-60% enalaprilata se vezuje za proteine plazme. Identifikovana su dva mesta vezivanja, jedno sa malim afinitetom i visokim kapacitetom i drugo sa visokim afinitetom i malim kapacitetom. Ovo drugo mesto predstavlja vezivanje enalaprilata za cirkulišući ACE u serumu. Podaci o distribuciji enalaprilata u CNS su ograničena, ali se čini da ovaj lek slabo prolazi hematoencefalnu barijeru i ne distribuira se u CNS. Enalaprilat prolazi kroz placentu, a utvrđeno je da se enalapril i enalaprilat u tragovima distribuira u mleko. U jetri se oko 60% resorbovanog enalapрила hidrolizuje (de-esterifikacija - reakcija prve faze metabolizma lekova) u enalaprilat, njegov jedini metabolit. Nepromenjeni enalapril i enalaprilat se primarno izlučuju putem bubrega.

Izlučivanje enalaprilata primarno zavisi od klirensa bubrega (kreatinin) tako da je klirens enalaprilata značajno manji kod starijih osoba u odnosu na mlađe. Terminalno vreme polueliminacije enalaprilata iznosi oko 38 sati.

3.2. Mehanizam antihipertenzivnog dejstva ACE inhibitora

Glavni mehanizam dejstva ACE inhibitora je kompetitivna inhibicija ACE. ACE je enzim primarno vezan za tkiva, mada manje od 10% cirkuliše u plazmi. Funkcionalni značaj tkivno vezanog ACE je pokazan na genetički izmenjenim miševima koji nemaju tkivni ACE, ali imaju cirkulišući ACE u plazmi. Takve životinje pokazuju nesposobnost da aktiviraju svoj renin-angiotenzinski sistem i sledstveno razvijaju hipertenziju (Esther i sar, 1997). Tačna funkcija cirkulišućeg ACE je nepoznata, ali pošto predstavlja malu količinu ukupnog ACE smatra se da njegova uloga nije značajna za farmakodinamski profil ACE inhibitora.

Stepen funkcionalne *in vivo* inhibicije tkivnog ACE izazvan primenom ACE inhibitora direktno zavisi od njihovog afiniteta za enzim i koncentracije slobodnog inhibitora u tkivima. Koncentracija slobodnog inhibitora u tkivu, s druge strane, zavisi od dinamičnog ekvilibrijuma između brzine dostavljanja ACE inhibitora tkivima i njihovog sledstvenog odlaska u krv.

U odnosu na jačinu (koja se dobija na osnovu kompetitivne inhibicije ACE i direktnog vezivanja ACE inhibitora za tkivni ACE) redosled lekova je sledeći: kvinaprilat = benazeprilat > ramiprilat > perindoprilat > lisinopril > enalaprilat > fosinopril > kaptopril (Fabris i sar, 1990; Fabris i sar, 1990; Johnston i sar, 1989; Johnston i sar, 1993; Kinoshita i sar, 1993).

Posledice inhibicije ACE su sprečavanje nastanka Ang II i smanjenje metabolizma bradikinina. Usled smanjenog nivoa Ang II i sledstvenog izostanka vazokonstrikcije, kao i povećanog nivoa bradikinina i sledstvene izražene vazodilatacije dolazi do smanjenja perifernog vaskularnog otpora i snižavanja krvnog pritiska koje nije praćeno refleksom tahikardijom. ACE inhibitori na ovaj način smanjuju priliv krvi u srce i njegovo opterećenje što smanjuje potrebe za kiseonikom. Ovi lekovi povećavaju i koronarno dopremanje kiseonika sprečavanjem vazokonstrikcije koronarnih krvnih sudova i povećanjem protoka krvi (Faxon i sar, 1982; Magrini i sar, 1988). Bolje

hemodinamske karakteristike i oksigenacija čuvaju srce od pojave dekompenzovane insuficijencije i ishemijskih oštećenja (Rouleau i sar, 1982; Chatterjee i sar, 1982).

Pokazano je da endogeni bradikinin (nastao usled smanjene razgradnje u uslovima inhibicije ACE) doprinosi kratkotrajnim efektima ACE inhibicije na krvni pritisak kod normotenzivnih i hipertenzivnih osoba, kao i na renin-angiotenzinski sistem (Gainer i sar, 1998). Slično je zabeleženo i u okviru efekata ACE inhibitora na endotelnu vazodilatatornu funkciju. Naime, Hornig i sar (1997) su pokazali da ACE inhibitori preko bradikinin zavisnog mehanizma povećavaju zavisno od protoka, endotelno-zavisnu vazodilataciju kod ljudi.

Pored glavnog mehanizma inhibicije ACE, ovi lekovi imaju i druge mehanizme delovanja koji doprinose njihovom antihipertenzivnom dejstvu. ACE inhibitori aktiviraju kininske receptore: B₂ receptore kao alosterne modulatori, a B₁ receptore kao agonisti, čijom aktivacijom raste NO kao jedan od njihovih transdukcionijskih signalnih molekula (Benzing i sar, 1999; Ignjatovic i sar, 2004; Kugaevskaya i Elisseeva, 2010; Erdös i sar, 2010). Pokazano je i da ovi lekovi smanjuju povećanu kardijalnu ekspresiju ACE i povećavaju smanjenu ekspresiju ACE2 kod spontano hipertenzivnih pacova čime stimulišu stvaranje Ang (1-7) (Yang i sar, 2013). Indirektno, smanjujući stvaranje Ang II, ACE inhibitori smanjuju sintezu aldosterona čime se povećava natriureza i smanjuje zapremina plazme (Gavras i sar, 1978).

3.3. Mehanizam protektivnog dejstva ACE inhibitora: oksidativni stres i NO

Eksperimentalna i klinička ispitivanja pokazuju da uslovi povećane aktivacije tkivnog i/ili cirkulatornog angiotenzinskog sistema značajno doprinose razvoju vaskularnog oksidativnog stresa. Na primer, u vaskularnom sistemu Ang II ima značajnu ulogu u nastanku oksidativnog stresa stimulišući aktivnost NADPH oksidaze i stvaranje superoksidnih anjona u endotelnim i glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova (Zhang i sar, 1999; Ushio-Fukai i sar, 1996). Povećani oksidativni stres dovodi do poremećaja u aktivnosti eNOS tako da eNOS stvara više superoksida nego NO (Mollnau i sar, 2002). Takođe, visoke koncentracije NO nastale usled aktivnosti iNOS, prisutne obično u uslovima inflamacije i oksidativnog stresa, većinom su odgovorne za ćelijska oštećenja najčešće kao posledica reakcije NO sa superoksidom i sledstvenog

nastanka peroksinitrita, visoko reaktivnog azotnog slobodnog radikala (Aktan i sar, 2004; Radi i sar, 1991).

ACE inhibitori pokazuju antioksidativna svojstva koja značajno doprinose njihovim protektivnim dejstvima (Deoghare i Kantharia, 2013; Kędziora-Kornatowska i sar, 2006). Mehanizmi antioksidativnog dejstva ovih lekova uključuju smanjenje prooksidativnih efekata Ang II usled inhibicije ACE, kao i povećanu aktivnost ACE2 i stvaranje Ang (1-7) koji prouzrokuju smanjenje aktivnosti NADPH oksidaze i sledstveno smanjenje koncentracije slobodnih radikala, prvenstveno superoksida (Hosomi i sar, 2001; Luque i sar, 1996; Yousif i sar, 2012). S druge strane, mehanizmima nezavisnim od inhibicije ACE, ACE inhibitori povećavaju sintezu i aktivnost komponenti antioksidativnog sistema, kako neenzimskih (glutation), tako i enzimskih (SOD, katalaza, glutacion peroksidaza i reduktaza) (Kędziora-Kornatowska i sar, 2000; de Cavanagh i sar, 1995; de Cavanagh i sar, 2000).

Značajno je istaći da antioksidativna svojstva ACE inhibitora učestvuju i u očuvanju bioiskoristljivosti NO koji takođe može doprineti njihovim protektivnim efektima. Očuvanje bioiskoristljivosti NO tokom primene ACE inhibitora rezultat je njihovog mehanizma koji uključuje, s jedne strane, smanjeno stvaranje superoksida, slobodnog radikala odgovornog za metabolizam NO, i regulaciju ekspresije i aktivnosti NOS enzima, s druge strane. Pokazano je da ACE inhibitor kvinapril povećava ekspresiju i aktivnost eNOS preko bradikinin zavisnog mehanizma, a smanjuje ekspresiju i aktivnost iNOS najverovatnije preko TNF α posredovanog mehanizma u aorti zdravih pacova (Bachetti i sar, 2001). Imidapril stimuliše ekspresiju iRNK i proteina eNOS i inhibiše ekspresiju iRNK i proteina iNOS na eksperimentalnom modelu hipertenzije u srcu pacova (Kobayashi i sar, 1999). Pokazano je i da kaptopril i enalapril povećavaju aktivnost, ali ne i ekspresiju, eNOS u srcu i aorti spontano hipertenzivnih pacova (Pechanova, 2007).

U kliničkoj studiji kod pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom pokazano je da enalapril povećava smanjenu koncentraciju glutaciona i NO, a smanjuje povećanu koncentraciju MDA u plazmi (Donmez i sar, 2002). Takođe, perindopril značajno povećava aktivnost SOD i katalaze i koncentraciju NO, a smanjuje koncentraciju MDA u krvi pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom u odnosu na njihove aktivnosti i koncentracije pre primene ovog leka (Kędziora-Kornatowska i sar, 2006).

Sve pomenute studije o antioksidativnom dejstvu ACE inhibitora odnose se na kardiovaskularni sistem, dok za sada nema podataka o njihovim antioksidativnim protektivnim efektima na nivou pljuvačnih žlezda i pljuvačke.

Pored ovih protektivnih efekata ACE inhibitori imaju i direktne protektivne efekte koji su posledica nedostatka Ang II – vazokonstrikcija, proliferacija glatkih mišića krvnih sudova, ruptira aterosklerotičnog plaka, kao i poboljšanje vaskularne endotelne funkcije, smanjenje hipertrofije leve komore srca i pojačavanje fibrinolize (Lonn i sar, 1994; Bakris, 2010).

3.4. ACE inhibitori i sekrecija pljuvačke

ACE inhibitori ispoljavaju relativno mali broj neželjenih efekata, od kojih je najčešći suv neproduktivan kašalj (usled nakupljanja bradikina u sluzokoži respiratornog trakta) (Torpet i sar, 2004). Od neželjenih oralnih efekata, ovi lekovi prouzrokuju angioedem, ulceracije i suvoću usta (Torpet i sar, 2004).

Pregledni radovi koji se odnose na oralne neželjene efekte antihipertenzivnih lekova navode da ACE inhibitori smanjuju lučenje pljuvačke i prouzrokuju kserostomiju (Saleh i sar, 2015; Scully i Bagan, 2004; Torpet i sar, 2004). Međutim, za sada postoji mali broj dobro dokumentovanih kliničkih studija koje to potvrđuju. Tako, na primer, na kserogeni efekat ACE inhibitora su pokazali Streckfus (1995) i Gislon da Silva (2004), ali samo u prikazima slučajeva. Nasuprot tome, ispitujući efekat kaptoprila nakon sedmodnevne primene u placebo kontrolisanoj studiji na zdravim volonterima, Nederfors i sar (1995) su pokazali povećanje protoka, kako nestimulisane, tako i stimulisane pljuvačke. ACE inhibitori u odnosu na druge kardiovaskularne lekove prouzrokuju statistički neznačajnu kserostomiju (Habbab i sar, 2010).

4. ORALNA HOMEOSTAZA I ANGIOTENZINSKI SISTEM U DIJABETES MELITUSU

Dijabetes melitus (DM) predstavlja metaboličko oboljenje multifaktorijalne etiologije koje se karakteriše hroničnom hiperglikemijom sa poremećajem metabolizma ugljenih hidrata, masti i proteina nastalom kao rezultat poremećaja sekreciji/aktivnosti insulina. Nekontrolisana hiperglikemija dovodi do stvaranja krajnjih proizvoda napredne glikacije, kao i oksidativnog stresa u plazmi i tkivima (West, 2000; Aslan i sar, 2007; Hosseini i Abdollahi, 2013; Duckworth, 2001). DM je oboljenje praćeno makrovaskularnim i mikrovaskularnim komplikacijama koje se manifestuju neuropatijom, nefropatijom, retinopatijom, hipertenzijom i aterosklerozom. Od oralnih komplikacija DM prate kserostomija, promene u protoku i sastavu pljuvačke, patodontipatija, karijes, kandidijaza, protezni stomatitis i usporeno zarastanje rana (Malicka i sar, 2014; Malicka i sar, 2015; Lakschevitz i sar, 2011; Sandberg i sar, 2000; Radović i sar, 2014).

Streckfus i sar (1994) su u stimulisanjoj parotidnoj pljuvački pacijenata sa DM pokazali niže koncentracije ukupnih proteina, dok su nivoi elektrolita, sIgA i protoka bili nepromenjeni u odnosu na pacijente bez DM. Vasconcelos i sar (2010) su pokazali da DM tip 2 izaziva hiposalivaciju u nestimulisanim i stimulisanim uslovima, mada razlika u frekvenci kserostomije između pacijenata sa i bez DM tip 2 nije zabeležena. Studije na pacijentima sa DM tip 1 i 2 pokazuju u ukupnoj nestimulisanjoj pljuvački više nivoje ukupnih proteina, mijeloperoksidaze i sIgA, kao i veću frekvencu kserostomije u poređenju sa pacijentima bez DM, dok je smanjenje protoka pljuvačke prisutno samo kod pacijenata sa DM tip 1 (Malicka i sar, 2014; Malicka i sar, 2015).

Kliničke studije pokazuju da DM utiče i na salivarni antioksidativni sistem. Reznick i sar (2006) su u pljuvački pacijenata sa DM tip 1, bez obzira na stepen kontrole oboljenja, pokazali značajno veću aktivnost enzimskih komponenti antioksidativnog sistema (peroksidaza, SOD), kao i veći nivo neenzimske komponente (mokraćna kiselina) u odnosu na pacijente bez DM. Takođe je pokazano da je totalni antioksidativni kapacitet pljuvačke za 56% veći kod pacijenata sa DM tip 1 u odnosu na one bez DM. Povećan antioksidativni potencijal pljuvačke pacijenata sa DM tip 1 u odnosu na ispitanike bez DM su pokazali i Astaneie i sar (2005). Što se tiče uticaja DM

tip 2 na salivarni antioksidativni sistem, zapažene su više koncentracije mokraćne kiseline i povećanu aktivnost SOD kod pacijenata sa DM, dok je nivo salivarnog glutaciona bio sličan onom kod ispitanika bez DM (Al-Rawi, 2011). S druge strane, Arana i sar (2006) su pokazali da je nivo salivarnog glutaciona niži kod pacijenata sa DM tip 2 u odnosu na ispitanike bez DM, dok je aktivnost enzima glutation peroksidaze i glutation reduktaze bila veća.

Poznato je da je u DM povećana aktivnost angiotenzinskog sistema. Fiordaliso i sar (2001) su pokazali da hiperglikemija stimuliše stvaranje Ang II preko aktivacije p53 i njegovog vezivanja za promotorna mesta gena za angiotenzinogen i AT₁ receptore u izolovanim kardiomiocitima pacova. Povećana ekspresija ACE je pokazana u bubrezima pacijenata sa dijabetičnom nefropatijom (Konoshita i sar, 2006).

Randomizovane, placebom - kontrolisane kliničke studije pokazuju da ACE inhibitori i u dijabetesu pored antihipertenzivnog dejstva imaju nefroprotektivne i kardioprotektivne efekte, te se danas koriste kao lekovi prvog izbora u terapiji hipertenzije udružene sa DM. Lewis i sar (1993) su pokazali da kod pacijenata sa DM tip 1 i proteinurijom kaptopril za 50 % smanjuje letalan ishod, potrebu za dijalizom i transplantacijom bubrega delimično mehanizmima nezavisnim od hipotenzivnog, zbog male razlike u postignutom smanjenju krvnog pritiska u odnosu na placebo. Takođe, ACE inhibitori kod pacijenata sa DM smanjuju rizik za nastanak infarkta miokarda, moždanog insulta i mikrovaskularnih komplikacija kao što je retinopatija (Yusuf i sar, 2000; Hansson i sar, 1999; Sowers, 1998; Chaturvedi i sar, 1998).

Podaci koji ukazuju u kojoj meri antioksidativna svojstva ACE inhibitora doprinose njihovom protektivnom efektu u odnosu na dijabetične komplikacije uglavnom se odnose na animalne studije, dok kod ljudi za sada nema podataka. De Cavanagh i sar (2001) su pokazali da su protektivni efekti enalapрила u DM posledica njegovog efekta na tkivnu redoks homeostazu jer ovaj lek sprečava smanjenje nivoa i funkcije antioksidanata (glutacion, SOD) koje nastaje tokom DM, kao i oksidaciju lipida i proteina. Fiordaliso i sar (2006) su pokazali da ACE inhibitori smanjuju stvaranje slobodnih radikala i sprečavaju nastanak fenotipskih promena u srcu (hipertrofija komore, perivaskularna fibroza) i aorti (smanjen odnos elastina i kolagena u mediji) pacova sa DM. Pokazano je i da se kardioprotektivno dejstvo ACE inhibitora povećava u prisustvu Ang (1-7) koji smanjuje dijabetesom izazvanu povećanu aktivnost NADPH

oksidaze u srcu pacova (Yousif i sar, 2012). Za sada nema podataka o efektu, kako angiotenzinskog sistema, tako ni ACE inhibitora, na oralnu homeostazu u dijabetes melitusu.

HIPOTEZE

Imajući u vidu različite podatke o efektu ACE inhibitora na protok pljuvačke, nedostatak podataka o efektima ovih lekova na antioksidativnu zaštitu i oksidativni stres u pljuvački, kao i o mehanizmima uključenim u ove efekte u pljuvačnim žlezdama ljudi, a što je od velikog značaja za održavanje oralne homeostaze, postavili smo sledeće hipoteze:

1. ACE inhibitori ne prouzrokuju hiposalivaciju i kserostomiju
2. ACE inhibitori smanjuju oksidativni stres uz povećanje antioksidativnog kapaciteta pljuvačke kod ljudi
3. U tkivu parotidne žlezde čoveka kao elementi angiotenzinskog sistema prisutni su: angiotenzin konvertirajući enzim (ACE), angiotenzin konvertirajući enzim 2 (ACE2) i receptor za angiotenzin II tip 1 (AT₁ receptor)

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U okviru istraživanja efekata ACE inhibitora na primeru enalapрила, kao najčešće primenjivanog leka ove grupe antihipertenziva, na mehanizme oralne homeostaze, postavili smo sledeće ciljeve istraživanja:

1. Odrediti protok ukupne nestimulisane pljuvačke kod pacijenata na terapiji enalaprilom - pacijenti sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih osoba.
2. Utvrditi prisustvo subjektivnog osećaja suvoće usta kod pacijenata na terapiji enalaprilom - pacijenti sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih osoba.
3. Odrediti prisustvo i koncentracije ACE i ACE2 u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački prikupljenoj jedan sat pre (minimalne koncentracije) i četiri sata posle (maksimalne koncentracije) primene jutarnje terapijske doze enalapрила kod pacijenata na terapiji ovim lekom - pacijenti sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih osoba.
4. Odrediti stepen oksidativnog stresa na nivou lipidne peroksidacije merenjem malondialdehida (MDA) u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački prikupljenoj jedan sat pre i četiri sata posle primene jutarnje terapijske doze enalapрила kod pacijenata na terapiji ovim lekom - pacijenti sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih osoba.
5. Odrediti stepen antioksidativnog kapaciteta merenjem totalnog antioksidativnog kapaciteta, koncentracija ukupnog glutaciona i aktivnosti SOD u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački prikupljenoj jedan sat pre i četiri sata posle primene jutarnje terapijske doze enalapрила kod pacijenata na terapiji ovim lekom - pacijenti sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih osoba.
6. Utvrditi prisustvo komponenti angiotenzinskog sistema u tkivu parotidne pljuvačne žlezde čoveka: ACE, ACE2 i receptor za angiotenzin II tip 1 (AT₁ receptor).
7. Odrediti koncentracije eNOS i iNOS u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački prikupljenoj jedan sat pre i četiri sata posle primene jutarnje terapijske doze enalapрила kod pacijenata na terapiji ovim lekom - pacijenti sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih osoba.

M A T E R I J A L I M E T O D E

1. ISPITIVANA POPULACIJA

Ova randomizovana studija preseka je obavljena na Kardiološkom odeljenju KBC Zvezdara u Beogradu, Domu zdravlja „Dr Jovan Jovanović Zmaj“, Stara Pazova, kao i klinikama Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu: Klinika za maksilofacijalnu hirurgiju, Klinika za oralnu hirurgiju i Klinika za bolesti zuba (Istraživačka laboratorija).

U studiju je uključeno ukupno 217 učesnika starosti 50 – 70 godina, oba pola, podeljenih u dve grupe. Prva grupa od 197 učesnika uključena je u ispitivanje efekata enalapрила na nivou pljuvačke, i to 137 pacijenata sa hipertenzijom među kojima 32 ima i DM tip 2, kao i 60 zdravih učesnika. Stoga, podgrupe u koje su učesnici randomizovani su sledeće: pacijenti sa hipertenzijom (podgrupa 1), pacijenti sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 (podgrupa 2), i zdravi učesnici (podgrupa 3 – kontrola). Druga grupa od 20 učesnika je uključena u ispitivanje komponenti angiotenzinskog sistema u tkivu i krvnim sudovima parotidne pljuvačne žlezde.

Veličina uzorka je izračunata primenom statističkog softvera G*Power 3.0.10. Na osnovu rezultata pilot studije (srednja vrednost protoka ukupne nestimulisane pljuvačke; standardna devijacija – 0,1; veličina efekta – 0,9) i $\alpha = 0,05$ uzorak od 197 učesnika uključenih u ispitivanje efekata enalapрила na nivou pljuvačke je bio dovoljan da se postigne snaga studije $> 95\%$ (ANOVA za nezavisne uzorke). Veličina uzorka za ispitivanje komponenti angiotenzinskog sistema u tkivu i krvnim sudovima parotidne žlezde nije statistički određena jer je cilj bio samo određivanje prisustva i koncentracije komponenti, a broj uključenih učesnika predstavlja frekvencu pacijenata na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu koji su ispunili kriterijume za uključivanje u studiju u periodu prikupljanja uzoraka tkiva (godinu dana).

Svi učesnici su potpisali informisani pismeni pristanak za učešće u studiji. Etički odbor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu odobrio je protokol istraživanja (broj 36/30; 2013). Istraživanje je sprovedeno u skladu sa etičkim principima Helsinške Deklaracije, kao i principima *Dobre kliničke prakse*.

1.1. Kriterijumi za uključivanje i isključivanje iz studije

Kriterijumi za uključivanje u studiju za ispitivanje efekata enalapрила na nivou pljuvačke su bili sledeći:

- za pacijente sa hipertenzijom: dugogodišnja terapija (minimum 1 godina) enalaprilom (10-40 mg/dan, oralno);
- za pacijente sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2: pored antihipertenzivne terapije enalaprilom (10-40 mg/dan, oralno), trajanje DM tip 2 najmanje godinu dana sa terapijom oralnim hipoglikemijskim lekom, metformin (1-2 g/dan, oralno) i vrednost glikozilisanog hemoglobina manja od 9% (HbA1c < 9%);
- za zdrave učesnike (kontrolna grupa): odsustvo sistemskih oboljenja, disfunkcije pljuvačnih žlezda, istorije zračne terapiji područja glave i vrata, kao i farmakoterapije u poslednjih 6 meseci.

Kriterijumi za uključivanje u studiju za ispitivanje komponenti angiotenzinskog sistema u tkivu i krvnim sudovima pljuvačnih žlezda su bili:

- indikovano hirurško lečenje benignih tumora parotidne žlezde
- odsustvo sistemskih hroničnih oboljenja (hipertenzija, DM tip 2 i dr.)
- odsustvo primene kserogenih lekova

Kriterijumi za isključivanje iz studije za oba pomenuta ispitivanja su bili:

- druga sistemska oboljenja (npr. Sjegrenov sindrom, reumatoidni artritis, oralni karcinom)
- dijagnostikovane bubrežne komplikacije hipertenzije i DM tip 2
- farmakoterapija (npr. antipsihotici, statini, antimuskarinski lekovi) koja utiče na funkciju pljuvačnih žlezda,
- primena lekova koji se izdaju bez lekarskog recepta,
- akutni periodontitis i ostale lokalne promene koje mogu uticati na protok i sastav pljuvačke
- pušenje

2. UZIMANJE UZORAKA ISPITIVANIH TKIVA I NJIHOVA PRIPREMA ZA LABORATORIJSKE ANALIZE

2.1. Pljuvačka

Kod svih učesnika koji su ispunili kriterijume za uključivanje u studiju za ispitivanje efekata enalapрила na nivou pljuvačke, posle kliničkog pregleda utvrđeno je prisustvo kserostomije i izmeren protok ukupne nestimulisane pljuvačke (UNP). Iz svake podgrupe je metodom slučajnog izbora izabrano po 16 ispitanika za analizu ACE, ACE2, komponenata oksidativnog stresa, eNOS i iNOS u pljuvački. Kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 uzorci pljuvačke su prikupljeni jedan sat pre i četiri sata posle primene jutarnje terapijske doze enalapрила.

Uzorci pljuvačke su uzimani jedan sat pre i četiri sata posle primene jutarnje terapijske doze enalapрила zbog farmakokinetičkih karakteristika enalapрила kao proleka; jedan sat pre primene – vreme u kome su koncentracije aktivnog metabolita enalapрила – enalaprilat, minimalne; četiri sata posle primene – vreme u kome se postiže maksimalna koncentracija enalaprilata (Arafat i sar, 2005).

Prikupljena pljuvačka je trenutno zamrznuta u tečnom azotu i čuvana u hladnjaku na temperaturi od -80°C do izvođena predviđenih analiza. Na dan eksperimenta uzorci pljuvačke su nakon postepenog dovođenja do sobne temperature centrifugirani na 12 000 obrtaja u minuti, tokom 10 minuta kako bi se uklonio debris.

2.2. Pljuvačne žlezde – tkivo i krvni sudovi parotidne žlezde

Za analizu komponenti angiotenzinskog sistema (ACE, ACE2 i AT_1 receptori) u pljuvačnim žlezdama je korišćeno 20 isečaka makroskopski zdravog tkiva parotidne žlezde za koje je histopatološka analiza pokazala odsustvo patoloških promena. Iz prikupljenih uzoraka tkiva izolovano je i 6 uzoraka parotidnih krvnih sudova. Izolovani uzorci su u hranljivom rastvoru (Krebs-Ringer-bikarbonatni rastvor - sastav, u mmol/L: NaCl 118,3; KCl 4,7; CaCl_2 2,5; MgSO_4 1,2; KH_2PO_4 1,2; NaHCO_3 25,0; glukoza 11,1) preneti do laboratorije i trenutno zamrznuti u tečnom azotu i na -80°C čuvani do daljih analiza.

Uzorci tkiva i krvnih sudova žlezde su dan pre eksperimenta mašinski homogenizovani u fosfatnom rastvoru (engl. Phosphate buffered saline – PBS) u odnosu

100 mg tkiva : 1 ml PBS. Homogenizovano tkivo je zatim centrifugirano na 12 000 obrtaja u minuti, u toku 10 minuta, kako bi se odvojio supernatant koji je prebačen u nove ependorfe i trenutno zamrznut u tečnom azotu i čuvan na -80°C do izvođenja eksperimenta.

3. EKSPERIMENTALNE METODE

3.1. Kserostomija i protok ukupne nestimulisane pljuvačke

Za utvrđivanje prisustva kserostomije korišćen je upitnik koji se sastojao od 4 pitanja sa odgovorima Da i Ne (Artico i sar, 2014):

1. Da li svakodnevno u poslednja 3 meseca imate osećaj suvoće usta?
2. Da li otežano gutate suhu hranu?
3. Da li često pijete vodu kako bi olakšali gutanje suve hrane?
4. Da li se budite noću da bi pili vode?

Učesnici koji su potvrdno odgovorili na najmanje jedno pitanje, svrstani su u grupu pacijenata sa kserostomijom, za razliku od učesnika sa svim negativnom odgovorima koji su raspoređeni u grupu bez kserostomije (Artico i sar, 2014).

Protok ukupne nestimulisane pljuvačke izmeren je kod svih učesnika između 8h i 13h metodom ispljuvavanja (Närhi i sar, 1992; van der Putten i sar, 2011). Učesnici su zamoljeni da najmanje jedan sat pre samog postupka ne konzumiraju hranu i napitke i da tokom trajanja postupka pokrete svedu na minimum. Ukratko, učesnik najpre proguta pljuvačku koja mu je u ustima, a zatim na svaki minut tokom 5 minuta ispljuvava u posudu od 50 ml. Protok pljuvačke je izražen kao količina pljuvačke izlučene po minuti (ml/min). Step salivacije je izražen kao veoma nizak (< 0,1 ml/min), nizak (između 0,1 ml/min i 0,2 ml/min) i normalan (iznad 0,2 ml/min) (Sreebny i Valdini, 1988).

3.2. Imunoesejska (ELISA) metoda

U ovom istraživanju za utvrđivanje prisustva i koncentracije molekula, i to ACE, ACE2, MDA vezanih za proteine, eNOS, iNOS i AT₁ receptora, u pljuvački pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, i kod zdravih učesnika, kao i tkivu i krvnim sudovima parotidne pljuvačne žlezde zdravih osoba, korišćen je „sendvič“ ELISA metod. Ovaj metod podrazumeva imobilizaciju ispitivanih molekula u bunarima mikrolejta primenom dva različita antitela specifična za ciljni molekul – antigen. Prvo, monoklonalno antitelo u tankom sloju oblaže dno bunara (*engl.* coating antibody), dok drugo antitelo, najčešće poliklonalno, identifikuje imobilisani molekul za koji se vezuje (*engl.* detection antibody).

Princip sendvič ELISA tehnike je sledeći. U prvom koraku, standardi i uzorci se nanose na dno bunara mikrolejta gde se tokom inkubacije (obično oko 2 sata, zavisno od protokola proizvođača) ispitivani molekul, ukoliko je prisutan, vezuje za antitela na dnu bunara. Posle inkubacije ispiranjem mikrolejta se uklanjaju nevezane supstance, a zatim dodaju antitela konjugovana sa biotinom, malim vitaminskim molekulom, pri čemu se formira kompleks antitelo - antigen (ispitivani molekul) - antitelo sa biotinom. Antitela sa biotinom koja se nisu vezala uklanjaju se iz bunara ispiranjem, nakon čega se dodaje enzim (najčešće peroksidaza poreklom iz rena; *engl.* Horseradish peroxidase – HRP), konjugovan sa avidinom, proteinom koji se vezuje za biotin. Nastali avidin-biotin sistem pojačava signal za detekciju vezanih molekula. Nevezani enzim-avidin reagens se nakon inkubacije ispira i dodaje se rastvor supstrata (najčešće 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin -TMB), supstance koja se pod dejstvom enzima rastvara i boji rastvor u bunaru. Boja se razvija u količini proporcionalnoj količini enzima odnosno vezanog molekula u inicijalnom koraku. Razvoj boje se zaustavlja rastvorom sumporne kiseline, a njen intenzitet (optička gustina) se zatim meri spektrofotometrijski na određenoj talasnoj dužini (najčešće 405nm ili 450nm). Spektrofotometar korišćen u ovoj studiji je MultiskanEX microplate reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Koncentracija molekula u uzorku se određuje pomoću optičke gustine uzorka interpolacijom sa standardne krive formirane na osnovu poznatih koncentracija standarda i njihovih očitanih optičkih gustina.

Tokom eksperimenata praćen je protokol proizvođača dobijen uz komercijalne ELISA kitove korišćene u studiji:

1. Quantikine® Human ACE Immunoassay (R&D Systems. Inc, Minneapolis, MN, USA);
2. Human Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) ELISA kit (Cusabio Biotech Co., Ltd, Wuhan, China);
3. OxiSelect™ MDA Adduct ELISA kit (Cell Biolabs. Inc, San Diego, CA, USA);
4. Human Nitric oxide synthase, endothelial, ELISA Kit (Wuhan EIAab Science Co., Ltd., Wuhan, China);
5. Human Inducible nitric oxide synthase (iNOS) ELISA Kit (MyBioSource. Inc, San Diego, CA, USA);
6. Human Angiotensin 2 Receptor 1 (ANG2R-1) ELISA Kit (Qayee Bio-Technology Co., Ltd, Shanghai, China).

3.3. Spektrofotometrijska metoda

Spektrofotometrijski metod je korišćen za kvantifikaciju antioksidativne zaštite (totalni antioksidativni kapacitet - TAC, ukupni glutation, SOD) u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, i kod zdravih učesnika. Ovaj metod podrazumeva merenje optičkih gustina obojenih rastvora gde se boja razvija pod dejstvom enzima. Svi eksperimenti su sprovedeni prema uputstvu proizviđača primenjenih eseja, a za merenje optičke gustine korišćen je spektrofotometar kao kod ELISA metoda: MultiskanEX microplate reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Za određivanje totalnog antioksidativnog kapaciteta pljuvačke korišćen je Antioxidant Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) koji podrazumeva primenu hidrosolubilnog analoga vitamina E (Trolox) kao ekvivalenta antioksidativnog kapaciteta – TEAC metod. Princip ovog eseja je zasnovan na oksidaciji ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sumporna kiselina) radikalom gvožđe-mioglobina (nastao od metmioglobina i vodonik peroksida) u katjon ABTS^{*+}, rastvorljivi hromogen zelene boje, koji se određuje spektrofotometrijski na talasnoj dužini 405nm. Antioksidanti prisutni u uzorku dozno-zavisno sprečavaju stvaranje katjona ABTS^{*+} pri

čemu intenzitet boje proporcionalno opada. Kao standard za određivanje koncentracije antioksidanasa koristi se Trolox™, hidrosolubilni analog vitamina E.

OxiSelect™ Total Glutathione Assay kit (Cell Biolabs. Inc, San Diego, CA, USA) je korišćen za kvantifikaciju slobodnog ukupnog glutaciona (redukovana forma – GSH i oksidovana forma – GSSG) u pljuvački. Princip eseja se zasniva na redukciji oksidovanog glutaciona u redukovani pod dejstvom glutacion reduktaze, a u prisustvu NADPH, i posledične reakcije hromogena sa tiolskom grupom redukovanog glutaciona koja dovodi do stvaranja obojene supstance čija se optička gustina meri na talasnoj gustini 405 nm. Sadržaj ukupnog glutaciona u uzorku se određuje na osnovu formirane standardne krive. Ovo je kinetički metod gde je brzina produkcije boje proporcionalna koncentraciji glutaciona u uzorku. Brzina se može odrediti iz promene absorbance tokom vremena.

Za određivanje aktivnosti SOD u uzorcima pljuvačke korišćen je SOD determination kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Ovaj esej koristi WST-1 (2 - (4 - jodofenil)- 3 -(4 - nitrofenil) – 5 - (2, 4 - disulfofenil) - 2H - tetrazolium, mononatrijum so), visoko solubilnu tetrazolijumovu so koja proizvodi hidrosolubilni formazan boju nakon reakcije sa superoksidnim anjonom. Pošto je absorbanca na 450 nm proporcionalna količini superoksidnih anjona, aktivnost SOD se može kvantifikovati merenjem smanjena u razvoju boje na 450nm. Za izračunavanje aktivnosti SOD koristi se sledeća jednačina:

$$\text{SOD aktivnost(\%)} = \frac{\{[(\text{Ablank1}-\text{Ablank3}) - (\text{Asample}-\text{Ablank2})] / (\text{Ablank1}- \text{Ablank3})\} \times 100}$$

3.4. Priliv antioksidanasa

U skladu sa studijama Moore i sar (1994) i Sculley i Langley-Evans (2003) koji su ukazali na značaj priliva antioksidanasa u usnu duplju u odnosu na njihovu apsolutnu koncentraciju, izrazili smo apsolutne koncentracije totalnog antioksidativnog kapaciteta i ukupnog glutaciona kao priliv antioksidanasa. Priliv antioksidanasa je izračunat na osnovu apsolutnih koncentracija antioksidanasa i protoka UNP učesnika uključenih u laboratorijsko ispitivanje pljuvačke primenom formule korišćene u studijama Moore i sar (1994) i Sculley i Langley-Evans (2003):

$$\text{Priliv antioksidanasa} = [\text{antioksidans}] / \text{protok UNP}$$

4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Rezultati studije su prikazani procentualno ili kao srednja vrednost \pm standardna greška srednje vrednosti (SD) u zavisnosti od tipa obeležja posmatranja, kvalitativni odnosno kvantitativni. Nakon utvrđivanja tipa raspodele podataka primenom

Kolmogorov-Smirnov testa za analizu podataka su primenjeni odgovarajući parametarski odnosno neparametarski testovi. P-vrednosti $< 0,05$ smatrane su statistički značajnim. Podaci su analizirani pomoću statističkog programa IBM SPSS Statistics za Windows, verzija 20,0 (Armonk, NY, USA).

U okviru ispitivanja demografskih karakteristika populacije hi kvadrat test (Chi Square test) je primenjen za analizu učestalosti hipertenzije i hipertenzije udružene sa DM tip 2, kao i analizu učestalosti polova, dok je za analizu starosti učesnika primenjena analiza varijanse za jedan faktor (One way ANOVA) praćena Bonferoni testom (Bonferroni Test). U populaciji pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 trajanje antihipertenzivne terapije i DM tip 2 je analizirano primenom Man-Vitni testa (Mann-Whitney test).

Korelacija između kserostomije i smanjenog protoka UNP u ispitivanoj populaciji analizirana je primenom Spirmanovog koeficijenta korelacije (Spearman's correlation coefficient).

Efekat enalapрила na kserostomiju u ispitivanoj populaciji analiziran je primenom Chi Square test, a na protok UNP primenom One way ANOVA analize praćene Bonferoni testom (Bonferroni test).

Frekvencija kserostomije/niskog protoka UNP i potencijalni faktori rizika u populaciji pacijenata na terapiji enalaprilom su analizirani Vald testom (Wald test). Uticaj nezavisnih faktora na pojavu kserostomije/niskog protoka UNP kod pacijenata na terapiji enalaprilom analiziran je binarnom logističkom regresijom (Binary logistic analysis), utvrđivanjem odnosa verovatnoća (OR) i 95% intervala poverenja (CI). Nezavisni faktori za koje je utvrđeno da su značajno povezani sa kserostomijom/niskom protokom UNP ($P < 0,05$) udruženi su i tako analizirani kako bi se identifikovali faktori rizika za razvoj kserostomije/niskog protoka UNP.

Koncentracija MDA vezanog za proteine u UNP pre i posle primene enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod

zdravih učesnika analizirana je između podgrupa Kruskal-Wallis Testom praćenim Mann-Whitney Testom, a u okviru podgrupe Wilcoxon Testom.

Razlike između podgrupa u TAC ukupne nestimulisane pljuvačke 1 sat pre primene enalapрила analizirane su primenom One way ANOVA analize za nezavisne uzorke, a 4 sata posle primene enalapрила Kruskal-Wallis Testom. U okviru podgrupe TAC je analiziran Student T testom za vezane uzorke.

Koncentracija ukupnog glutaciona u UNP pre i posle primene enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika između podgrupa analiziran je Kruskal-Wallis Testom, a u okviru podgrupe Student T test za vezane uzorke.

Aktivnost SOD u UNP pre i posle primene enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika između podgrupa analiziran je primenom One way ANOVA za nezavisne uzorke, a u okviru podgrupe Student T test za vezane uzorke.

Priliv antioksidanasa (ukupnih i glutaciona) i protok UNP učesnika uključenih u laboratorijsko ispitivanje pljuvačke analiziran je između podgrupa (pacijenti sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, i zdravi) primenom One way ANOVA analize praćene Bonferroni testom, a u okviru podgrupa hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 u odnosu na vreme primene enalapрила primenom Student T test za vezane uzorke.

Korelacija između priliva antioksidanasa (ukupnih i glutaciona) i protoka UNP u celoj populaciji (N=48; pacijenti sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, i zdravi učesnici), kao i populaciji pacijenata na terapiji enalaprilom (N=32; pacijenti sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2) analizirana je primenom Pearsonovog koeficijenta korelacije (Pearson correlation coefficient).

Koncentracija ACE u UNP pre i posle primene enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika između podgrupa analiziran je Kruskal-Wallis Testom, a u okviru podgrupe Student T test za vezane uzorke.

Koncentracija ACE2 u UNP pre i posle primene enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika

između podgrupa analiziran je primenom One way ANOVA za nezavisne uzorke praćene Bonferroni testom, a u okviru podgrupe Student T test za vezane uzorke.

Razlike u koncentracijama ACE i ACE2 u UNP, tkivu i krvnim sudovima parotidne žlezde zdravih osoba analizirane su Mann-Whitney testom, dok su razlike u nivou ACE odnosno ACE2 između tkiva (UNP, tkivo i krvni sudovi parotidne žlezde) analizirane Kruskal-Wallis Testom praćenim Mann-Whitney testom.

Za analizu koncentracije AT₁ receptora u tkivu i krvnim sudovima parotidne žlezde zdravih osoba primenjen je Student T test za nezavisne uzorke.

Koncentracija eNOS u UNP pre i posle primene enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika između podgrupa analiziran je primenom One way ANOVA za nezavisne uzorke praćene Bonferroni testom, a u okviru podgrupe Student T test za vezane uzorke.

Koncentracija iNOS u UNP pre i posle primene enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika između podgrupa analiziran je primenom One way ANOVA za nezavisne uzorke, a u okviru podgrupe Student T test za vezane uzorke.

Za komparativnu analizu nivoa eNOS i iNOS u UNP pljuvački primenjen je Student T test za vezane uzorke.

REZULTATI

1. DEMOGRAFSKI PODACI

U Tabeli 1 su prikazane karakteristike populacije uključene u ispitivanje efekata enalapрила na nivou pljuvačke: zdravi učesnici, pacijenti sa hipertenzijom i pacijenti sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2. U odnosu na ukupan broj učesnika, većinu su predstavljali pacijenti sa hipertenzijom. Prosečna starost svih učesnika je bila $61,15 \pm 6,03$ godina i većina je bila ženskog pola. Pacijenti su u proseku 8,5 godina bili na terapiji enalaprilom, dok su pacijenti sa DM tip 2 imali ovo oboljenje oko 9 godina.

Za ispitivanje prisustva angiotenzinskog sistema u tkivu parotidne pljuvačne žlezde uključeno je još 20 učesnika sa indikovanom parotidektomijom (bez sistemskih oboljenja) prosečne starosti $60,9 \pm 6,91$ godina, oba pola (muški=6; ženski=14) (podaci nisu prikazani). Pored uzoraka tkiva žlezde izolovano je i 6 uzoraka krvnih sudova parotidne pljuvačne žlezde koji su takođe uključeni u ispitivanje angiotenzinskog sistema.

Tabela 1 Karakteristike populacije uključene u ispitivanje efekata enalapрила na nivou ukupne nestimulisane pljuvačke

<i>Varijable</i>	<i>Učestalost</i>	<i>%</i>	<i>Srednja vrednost ± SD</i>	<i>P-vrednost</i>
Prisustvo hipertenzije i DM tip 2				
Bez	60	30,5		
Sa hipertenzijom	105	53,3		<0,001^a
Sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2	32	16,2		<0,001^a
Starost (godine)				
Zdravi učesnici			57,47±5,75	
Pacijenti sa hipertenzijom			62,72±5,42	<0,001^b
Pacijenti sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2			62,91±5,52	<0,001^b
Pol				
Muški	80	40,6		
Ženski	117	59,4		0,008^c
Trajanje antihipertenzivne terapije (godine)				
Pacijenti sa hipertenzijom			8,59±5,31	
Pacijenti sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2			8,21±7,11	0,386^d
Trajanje DM tip 2 (godine)				
Pacijenti sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2			9,08±7,41	0,880^e

P – vrednost (< 0,05)

^a Prisustvo hipertenzije/hipertenzije udružene sa DM tip 2 vs zdravi učesnici (Chi Square test)

^b Starost pacijenata sa hipertenzijom/hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 vs zdravi učesnici (One way ANOVA praćena Bonferroni testom)

^c Pol – ženski vs muški (Chi Square test)

^d Trajanje antihipertenzivne terapije – pacijenati sa hipertenzijom vs hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 (Mann-Whithney test)

^e Trajanje antihipertenzivne terapije (svi pacijenti sa hipertenzijom) vs trajanje DM tip 2 (Mann-Whithney test)

2. KSEROSTOMIJA I STEPEN SALIVACIJE – UČESTALOST I KORELACIJA

Kserostomija u ispitivanoj populaciji je zabeležena kod 3,69 puta manjeg broja učesnika, u odnosu na one učesnike bez kserostomije (podaci nisu prikazani).

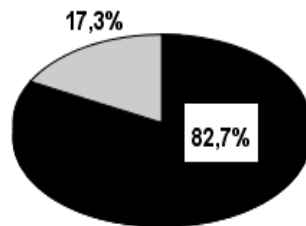
Stepen salivacije je predstavljen kao veoma nizak (protok UNP manji od 0,1ml/min), nizak (protok UNP između 0,1ml/min i 0,2ml/min) i normalan (protok UNP veći od 0,2ml/min).

U ispitivanoj populaciji, niko od učesnika nije imao veoma nizak stepen salivacije, dok je normalan stepen salivacije postojao kod njih 85% (podaci nisu prikazani).

Na Grafiku 1 prikazana je procentualna zastupljenost kserostomije u ukupnoj populaciji, kako kod učesnika sa normalnim stepenom salivacije, tako i kod učesnika sa niskim stepenom salivacije.

U ukupnoj ispitivanoj populaciji zabeležena je značajna pozitivna korelacija između kserostomije i niskog stepena salivacije (Spirmanov koeficijent korelacije: $\sigma = 0,238$; $P=0,001$).

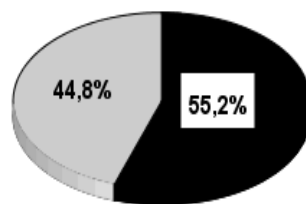
Normalan stepen salivacije



Prisustvo kserostomije

■ Učesnici bez kserostomije
□ Učesnici sa kserostomijom

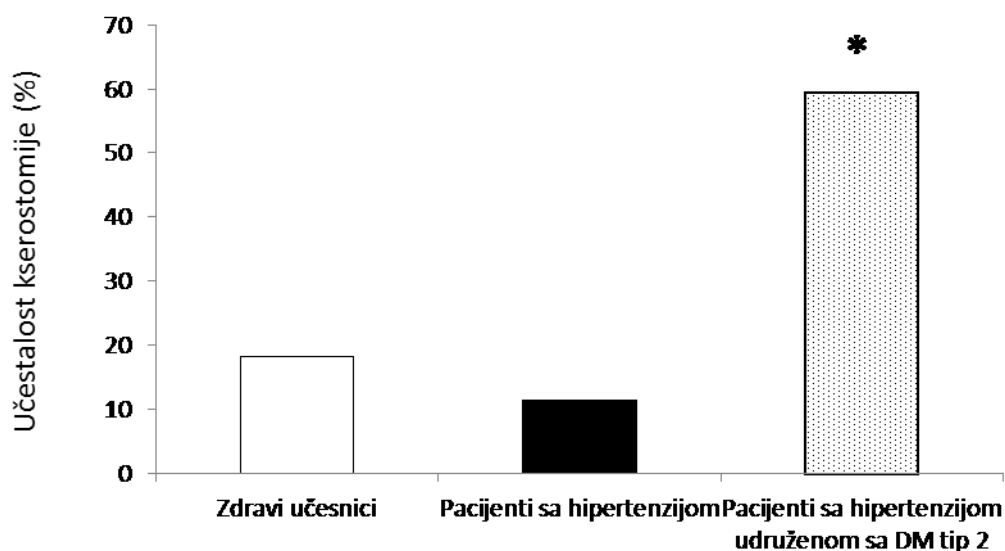
Nizak stepen salivacije



Grafik 1 Prisustvo kserostomije kod učesnika sa normalnim i niskim stepenom salivacije u ispitivanoj populaciji

3. ENALAPRIL I KSEROSTOMIJA

Na Grafiku 2 prikazan je efekat enalapрила na prisustvo kserostomije kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, u odnosu na zdrave učesnike. Značajno veća učestalost kserostomije zabeležena je kod pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 u odnosu na zdrave učesnike ($P=0,000$).



Grafik 2 Efekat enalapрила na kserostomiju kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 u odnosu na zdrave učesnike

* $P < 0,05$ pacijenti sa hipertenzijom vs zdravi učesnici (Chi-square test)

Primenom binarne logističke regresije, u populaciji pacijenata na terapiji enalaprilom, analizirani su faktori koji utiču na pojavu kserostomije, kao što su: pol, prisustvo DM tip 2, stepen salivacije, starost i trajanje antihipertenzivne terapije (Tabela 2). Analiza je pokazala da je među ispitivanim faktorima prisustvo DM tip 2 povećalo rizik za pojavu kserostomije 11,11 puta, a nizak stepen salivacije 3,33 puta. S druge strane, udruživanjem ovih faktora (DM tip 2, nizak stepen salivacije), rezultati su pokazali da je samo DM tip 2 značajno povezan sa razvojem kserostomije.

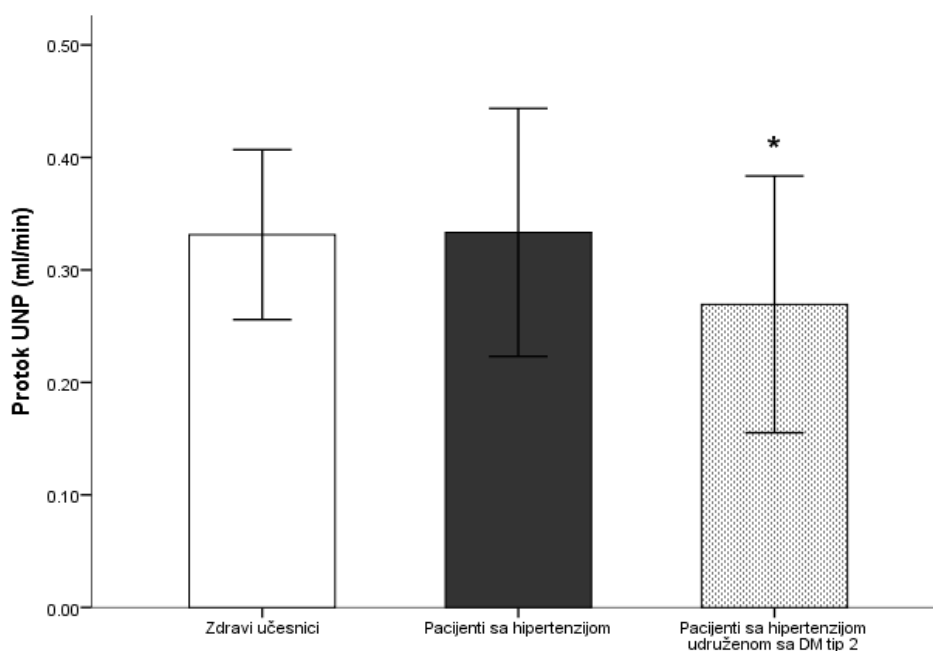
Tabela 2 Uticaj nezavisnih i udruženih faktora na pojavu kserostomije kod pacijenata na terapiji enalaprilom

<i>Varijable</i>	<i>Kategorija</i>	<i>OR (95% CI)</i>	<i>P-vrednost</i>	<i>AOR (95% CI)</i>	<i>P-vrednost</i>
Pol	Muški	1			
	Ženski	1,23 (0,54-2,81)	0,626		
DM Tip 2 (prisustvo)	Odsustvo	1			
	Prisustvo	0,09 (0,04-0,22)	<0,001	0,10 (0,04-0,26)	<0,001
Stepen salivacije	Normalan	1			
	Nizak	0,30 (0,12-0,75)	0,010	0,57(0,19-1,67)	0,303
Starost (godine)	< 65	1			
	≥ 65	1,02 (0,45-2,30)	0,959		
Trajanje antihipertenzivne terapije (godine)	< 10	1			
	≥ 10	0,97 (0,43-2,16)	0,935		

OR – (odds ratio) - odnos verovatnoća pojave kserostomije kod nezavisnih faktora;
AOR – (adjusted odds ratio) - odnos verovatnoća pojave kserostomije kod udruženih faktora;
CI- interval poverenja;
P-vrednost Wald testa

4. ENALAPRIL I PROTOK PLJUVAČKE

Efekat enalapрила na protok UNP kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 u odnosu na zdrave učesnike je prikazan na Grafiku 3. Značajno manji protok UNP, u odnosu na zdrave, zabeležen je kod pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 ($P=0,018$).



Grafik 3 Efekat enalapрила na protok UNP kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 u odnosu na zdrave učesnike

* $P<0,05$ pacijenti sa hipertenzijom vs zdravi učesnici (One-way ANOVA praćena Bonferroni testom)

Od ispitivanih faktora koji utiču na pojavu niskog protoka UNP kod pacijenata na terapiji enalaprilom (pol, prisustvo DM tip 2, starost i trajanje antihipertenzivne terapije) binarna logistička regresija je pokazala da je rizik za pojavu niskog protoka bio 3,57 puta veći kod pacijenata ženskog pola, a 4,76 puta veći u prisustvu DM tip 2 (Tabela 3). Analiza je pokazala da ovi faktori (pol-ženski, DM tip 2) udruženi značajno više doprinose razvoju niskog protoka UNP.

Tabela 3 Uticaj nezavisnih i udruženih faktora na pojavu niskog protoka UNP kod pacijenata na terapiji enalaprilom

<i>Varijable</i>	<i>Kategorija</i>	<i>OR (95% CI)</i>	<i>P-vrednost</i>	<i>AOR (95% CI)</i>	<i>P-vrednost</i>
Pol	Muški	1			
	Ženski	0,28 (0,09-0,86)	0,026	0,25 (0,08-0,81)	0,021
DM Tip 2 (prisustvo)	Odsustvo	1			
	Prisustvo	0,21 (0,08-0,52)	0,001	0,19 (0,07-0,49)	0,001
Starost (godine)	< 65	1			
	≥ 65	0,68 (0,29-1,61)	0,381		
Trajanje antihipertenzivne terapije (godine)	< 10	1			
	≥ 10	1,12 (0,47-2,65)	0,800		

OR – (odds ratio) - odnos verovatnoća pojave niskog protoka kod nezavisnih faktora;
AOR – (adjusted odds ratio) - odnos verovatnoća pojave niskog protoka kod udruženih faktora; CI-
interval poverenja;
P-vrednost Wald testa

5. ENALAPRIL: OKSIDATIVNI STRES I ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA

Stepen oksidativnog stresa određen koncentracijom MDA vezanog za proteine u UNP (prikupljena jedan sat pre i četiri sata posle primene jutarnje terapijske doze enalapрила) kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika prikazan je u Tabeli 4. U odnosu na zdrave učesnike, nisu zabeležene značajne razlike u koncentracijama MDA vezanog za proteine u pljuvački pre primene enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom, kao i pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2. Nasuprot tome, u pljuvački prikupljenoj 4 sata posle primene enalapрила koncentracije MDA vezanog za proteine su bile značajno niže kod pacijenata sa hipertenzijom ($P=0,001$), kao i pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 ($P=0,004$) u odnosu na zdrave učesnike.

Poređenjem koncentracija MDA vezanog za proteine u UNP u odnosu na vreme primene enalapрила, 1 sat pre i 4 sata posle, nisu zabeležene značajne razlike kod pacijenata sa hipertenzijom, kao i pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 (Tabela 4).

Tabela 4 Koncentracije MDA vezanog za proteine (pmol/mg) u UNP pre i posle primene enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika

Koncentracije MDA vezanog za proteine (pmol/mg)			
Grupe učesnika	srednja vrednost±SD		**P- vrednost
Zdravi učesnici (N=16)	745,62±680,05		
	1h pre primene enalapрила	4h posle primene enalapрила	
Pacijenti sa hipertenzijom (N=16)	313,44±616,32	34,38±16,42*	0,108
Pacijenti sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 (N=16)	248,13±575,48	38,75±16,48*	0,107
<i>*P- vrednost</i>	0,057	0,001	

* $P < 0,05$ pacijenti na terapiji enalaprilom vs zdravi učesnici (Kruskal-Wallis Test praćen Mann-Whitney Testom)

** $P < 0,05$ 1h pre vs 4h posle primene enalapрила (Wilcoxon Test)

U Tabeli 5 prikazan je nivo TAC u UNP (prikupljena jedan sat pre i četiri sata posle primene jutarnje terapijske doze enalapрила) kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika. U odnosu na zdrave učesnike, nisu zabeležene značajne razlike u nivou TAC kod pacijenata sa hipertenzijom, kao i pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kako pre, tako i posle primene enalapрила.

Poređenjem nivoa TAC u UNP u odnosu na vreme primene enalapрила, nisu zabeležene značajne razlike kod pacijenata sa hipertenzijom, kao i pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 (Tabela 5).

Tabela 5 Nivo TAC (μM) u UNP pre i posle primene enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika

Grupe učesnika	Nivo TAC (μM)		**P- vrednost
	srednja vrednost \pm SD		
Zdravi učesnici (N=16)	460,0 \pm 250,0		
	1h pre primene enalapрила	4h posle primene enalapрила	
Pacijenti sa hipertenzijom (N=16)	370,0 \pm 180,0	360,0 \pm 130,0	0,889
Pacijenti sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 (N=16)	340,0 \pm 140,0	400,0 \pm 260,0	0,533
	<i>*P- vrednost</i>	0,231	0,549

*P < 0,05 pacijenti na terapiji enalaprilom vs zdravi učesnici (One-way ANOVA - 1h pre; Kruskal-Wallis Test - 4h posle)

**P < 0,05 1h pre vs 4h posle primene enalapрила (Student t test za vezane uzorke)

Koncentracije ukupnog glutaciona u UNP (prikupljena jedan sat pre i četiri sata posle primene jutarnje terapijske doze enalapрила) kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika prikazane su u Tabeli 6. U odnosu na zdrave učesnike, nisu zabeležene značajne razlike u koncentracijama ukupnog glutaciona kod pacijenata sa hipertenzijom, kao i pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kako pre, tako i posle primene enalapрила.

Poređenjem koncentracija ukupnog glutaciona u UNP u odnosu na vreme primene enalapрила, nisu zabeležene značajne razlike, kako kod pacijenata sa hipertenzijom, tako i pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 (Tabela 6).

Tabela 6 Koncentracije ukupnog glutaciona (μM) u UNP pre i posle primene enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih ispitanika

Grupe učesnika	Koncentracije ukupnog glutaciona (μM)		**P- <i>vrednost</i>
	srednja vrednost \pm SD		
Zdravi učesnici (N=16)	0,09 \pm 0,08		
	1h pre primene enalapрила	4h posle primene enalapрила	
Pacijenti sa hipertenzijom (N=16)	0,13 \pm 0,18	0,05 \pm 0,05	0,172
Pacijenti sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 (N=16)	0,11 \pm 0,10	0,05 \pm 0,05	0,102
*P- vrednost	0,985	0,066	

* $P < 0,05$ pacijenti na terapiji enalaprilom vs zdravi učesnici (Kruskal-Wallis Test)

** $P < 0,05$ 1h pre vs 4h posle primene enalapрила (Student t test za vezane uzorke)

U Tabeli 7 prikazana je aktivnost SOD u UNP (prikupljena jedan sat pre i četiri sata posle primene jutarnje terapijske doze enalapрила) kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika. U odnosu na zdrave učesnike, nisu zabeležene značajne razlike u aktivnosti SOD kod pacijenata sa hipertenzijom, kao i pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kako pre, tako i posle primene enalapрила.

Poređenjem aktivnosti SOD u UNP u odnosu na vreme primene enalapрила, kod pacijenata sa hipertenzijom aktivnost ovog enzima je bila značajno manja nakon primene leka u odnosu na aktivnost pre primene. Nasuprot tome, kod pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 nije bilo značajne razlike u aktivnosti SOD u odnosu na vreme primene leka (Tabela 7).

Tabela 7 Aktivnost SOD (%) u UNP pre i posle primene enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika

Grupe učesnika	Aktivnost SOD (%)		<i>**P-</i> <i>vrednost</i>
	srednja vrednost±SD		
Zdravi učesnici (N=16)	42,46±14,38		
	1h pre primene enalapрила	4h posle primene enalapрила	
Pacijenti sa hipertenzijom (N=16)	53,43±14,86	36,61±14,98**	<0,001
Pacijenti sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 (N=16)	48,21±12,96	38,02±18,57	0,111
<i>*P- vrednost</i>	0,100	0,565	

**P* < 0,05 pacijenti na terapiji enalaprilom vs zdravi učesnici (One-way ANOVA za nezavisne uzorke)

***P* < 0,05 1h pre vs 4h posle primene enalapрила (Student t test za vezane uzorke)

U Tabeli 8 prikazan je prilikom ukupnih antioksidanasa i prilikom ukupnog glutaciona u UNP (prikupljena jedan sat pre i četiri sata posle primene jutarnje terapijske doze enalaprila) kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika.

U odnosu na zdrave učesnike, nisu zabeležene značajne razlike u prilikom antioksidanasa kod pacijenata sa hipertenzijom, kako pre, tako i posle primene enalaprila, dok je prilikom antioksidanasa kod pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 bio značajno manji pre i posle primene enalaprila. Poređenjem priliva antioksidanasa u odnosu na vreme primene enalaprila, nisu zabeležene značajne razlike, kako kod pacijenata sa hipertenzijom, tako i pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 (Tabela 8).

U odnosu na zdrave učesnike, nisu zabeležene značajne razlike u prilikom glutaciona kod pacijenata sa hipertenzijom, kao i pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kako pre, tako i posle primene enalaprila. Poređenjem priliva glutaciona u UNP u odnosu na vreme primene enalaprila, nisu zabeležene značajne razlike, kako kod pacijenata sa hipertenzijom, tako i pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 (Tabela 8).

Tabela 8 Priliv ukupnih antioksidanasa ($\mu\text{M}/\text{min}$) i priliv ukupnog glutatona (nM/min) u UNP pre i posle primene enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika

Grupe učesnika	Protok (ml/min)		Priliv ukupnih antioksidanasa ($\mu\text{M}/\text{min}$)		Priliv ukupnog glutatona (nM/min)						
	srednja vrednost	$\pm\text{SD}$	$**P$ - vrednost	srednja vrednost	$\pm\text{SD}$	$**P$ - vrednost					
Zdravi učesnici (N=16)	0,42	$\pm 0,11$		0,22	$\pm 0,12$	0,03	$\pm 0,02$				
Pacijenti sa hipertenzijom (N=16)	1h pre primene enalapрила	4h posle primene enalapрила	1h pre primene enalapрила	4h posle primene enalapрила	1h pre primene enalapрила	4h posle primene enalapрила					
	0,35	$\pm 0,11$	0,36	$\pm 0,09$	0,14	$\pm 0,10$	0,14	$\pm 0,06$	0,04	$\pm 0,04$	0,02
Pacijenti sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 (N=16)	1h pre primene enalapрила	4h posle primene enalapрила	1h pre primene enalapрила	4h posle primene enalapрила	1h pre primene enalapрила	4h posle primene enalapрила					
	0,26	$\pm 0,10^*$	0,27	$\pm 0,14^*$	0,09	$\pm 0,04^*$	0,10	$\pm 0,06^*$	0,03	$\pm 0,03$	0,02
$*P$ - vrednost	<0,001	0,001	0,001	0,002	0,662	0,265					

$*P < 0,05$ pacijenti na terapiji enalaprilom vs zdravi učesnici (One-way ANOVA za nezavisne uzorke, praćena Bonferroni testom)

$**P < 0,05$ 1h pre vs 4h posle primene enalapрила (Student t test za vezane uzorke)

U Tabeli 9 prikazana je korelacija između priliva ukupnih antioksidanasa i protoka UNP, kao i priliva ukupnog glutaciona i protoka UNP u populaciji zdravih učesnika, populaciji pacijenata na terapiji enalaprilom (pacijenti sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2), i celoj populaciji (pacijenti sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 i zdravi učesnici). Između priliva ukupnih antioksidanasa i protoka UNP zapažena je značajna pozitivna korelacija, kako u celoj populaciji, tako i populaciji pacijenata na terapiji enalaprilom. Značajna negativna korelacija između priliva glutaciona i protoka UNP zapažena je u populaciji zdravih učesnika, dok je korelacija izostala u celoj populaciji i populaciji pacijenata na terapiji enalaprilom.

Tabela 9 Korelacija između priliva antioksidanasa (ukupni i glutacioni) i protoka UNP u populaciji zdravih učesnika, pacijenata na terapiji enalaprilom, kao i celoj populaciji

Protok UNP	Priliv ukupnih antioksidanasa		Priliv glutaciona	
	1h pre primene enalapрила	4h posle primene enalapрила	1h pre primene enalapрила	4h posle primene enalapрила
Zdravi učesnici (N=16)	$r = 0,182$ $P=0,500$		$r = - 0,628$ $P=0,009$	
Pacijenti na terapiji enalaprilom (N=32)	$r = 0,651$ $P<0,001$	$r = 0,606$ $P<0,001$	$r = 0,108$ $P=0,556$	$r = 0,323$ $P=0,071$
Cela populacija (N=48)	$r = 0,554$ $P<0,001$	$r = 0,493$ $P<0,001$	$r = - 0,044$ $P=0,766$	$r = 0,113$ $P=0,443$

r = Pirsonov koeficijent korelacije

P - vrednost < 0,05

6. KONCENTRACIJE ACE I ACE2 U UKUPNOJ NESTIMULISANOJ PLJUVAČKI PACIJENATA NA TERAPIJI ENALAPRILOM I ZDRAVIH OSOBA, KAO I TKIVU I KRVNIM SUDOVIIMA PAROTIDNE ŽLEZDE ZDRAVIH OSOBA

Koncentracije ACE u UNP (prikupljena jedan sat pre i četiri sata posle primene jutarnje terapijske doze enalapрила) kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika prikazane su u Tabeli 10. U odnosu na zdrave učesnike, nisu zabeležene značajne razlike u koncentracijama ACE kod pacijenata sa hipertenzijom, kao i pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kako pre, tako i posle primene enalapрила.

Poređenjem koncentracija ACE u UNP u odnosu na vreme primene enalapрила, nisu zabeležene značajne razlike, kako kod pacijenata sa hipertenzijom, tako i pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 (Tabela 10).

Tabela 10 Koncentracije ACE (ng/ml) u UNP pre i posle primene enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika

Grupe učesnika	Koncentracije ACE (ng/ml)		**P- vrednost
	srednja vrednost±SD		
Zdravi učesnici (N=16)	7,02±11,96		
	1h pre primene enalapрила	4h posle primene enalapрила	
Pacijenti sa hipertenzijom (N=16)	7,55±5,99	4,67±1,49	0,054
Pacijenti sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 (N=16)	3,75±2,57	4,25±2,60	0,651
<i>*P- vrednost</i>	0,064	0,225	

*P < 0,05 pacijenti na terapiji enalaprilom vs zdravi učesnici (Kruskal-Wallis Test)

**P < 0,05 1h pre vs 4h posle primene enalapрила (Student t test za vezane uzorke)

U Tabeli 11 prikazane su koncentracije ACE2 u UNP (prikupljena jedan sat pre i četiri sata posle primene jutarnje terapijske doze enalapрила) kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika. U odnosu na zdrave učesnike, zabeležena je značajno viša koncentracija ACE2 u pljuvački prikupljenoj 1 sat pre primene enalapрила kako kod pacijenata sa hipertenzijom ($P=0,000$), tako i pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 ($P=0,000$). U odnosu na zdrave učesnike, u UNP 4 sata nakon primene enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom postojala je značajno viša koncentracija ACE2 ($P=0,000$), dok kod pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 koncentracija ACE2 nije bila statistički značajno različita. Nije bilo razlike u koncentraciji salivarnog ACE2 između pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom sa DM tip 2, kako 1 sat pre, tako i 4 sata posle primene enalapрила.

Poređenjem koncentracija ACE2 u UNP u odnosu na vreme primene enalapрила, nisu zabeležene značajne razlike, kako kod pacijenata sa hipertenzijom, tako i pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 (Tabela 11).

Tabela 11 Koncentracije ACE2 (ng/ml) u UNP pre i posle primene enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika

Grupe učesnika	Koncentracije ACE2 (ng/ml)		**P- vrednost
	srednja vrednost±SD		
Zdravi učesnici (N=16)	0,08±0,04		
	1h pre primene enalapрила	4h posle primene enalapрила	
Pacijenti sa hipertenzijom (N=16)	0,18±0,05*	0,21±0,10*	0,467
Pacijenti sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 (N=16)	0,16±0,07*	0,14±0,08	0,532
<i>*P- vrednost</i>	<0,001	<0,001	

*P < 0,05 pacijenti na terapiji enalaprilom vs zdravi učesnici (One-way ANOVA praćena Bonferroni testom)

**P < 0,05 1h pre vs 4h posle primene enalapрила (Student t test za vezane uzorke)

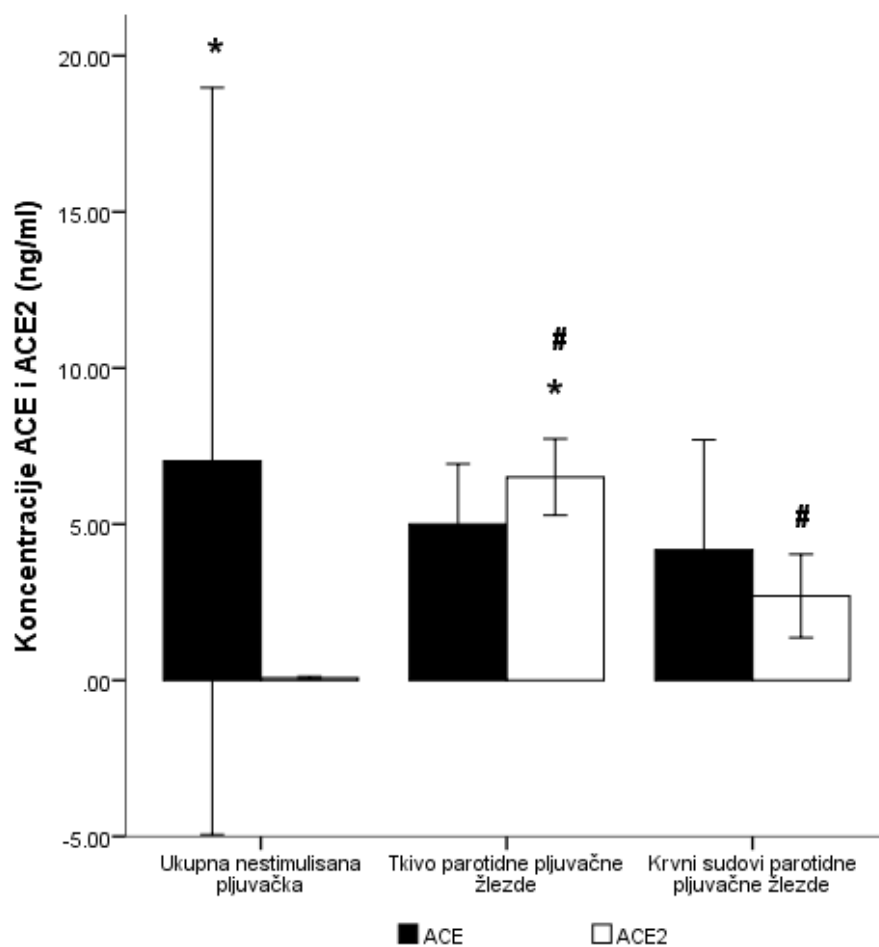
U Tabeli 12 prikazane su koncentracije ACE i ACE2 u tkivu i krvnim sudovima parotidne pljuvačne žlezde zdravih osoba.

Tabela 12 Koncentracije ACE (ng/ml) i ACE2 (ng/ml) u tkivu i krvnim sudovima parotidne pljuvačne žlezde zdravih osoba

Parotidna pljuvačna žlezda	Koncentracije ACE (ng/ml) srednja vrednost±SD	Koncentracije ACE2 (ng/ml) srednja vrednost±SD
Tkivo (N=20)	5,00 ± 1,92	6,51 ± 1,22
Krvni sudovi (N=6)	4,18 ± 3,52	2,70 ± 1,33

Na Grafiku 4 prikazana je komparativna statistička analiza koncentracija ACE i ACE2 (ng/ml) u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački, tkivu i krvnim sudova parotidne pljuvačne žlezde zdravih osoba. Koncentracija ACE u UNP zdravih učesnika je bila značajno viša od koncentracije ACE2. Koncentracija ACE2 u tkivu parotidne pljuvačne žlezde zdravih osoba je bila značajno viša od koncentracije ACE. U krvnim sudovima parotidne pljuvačne žlezde zdravih osoba nisu zabeležene značajne razlike između koncentracije ACE i ACE2.

U odnosu na tkivno poreklo enzima, nisu zabeležene značajne razlike u koncentraciji ACE među ispitivanim tkivima, dok su značajno više koncentracije ACE2 zabeležene u tkivu i krvnim sudovima parotidne žlezde u odnosu na pljuvačku zdravih učesnika (Grafik 4).



Grafik 4 Komparativna statistička analiza koncentracija ACE i ACE2 (ng/ml) u ukupnoj nestimuliranoj pljuvački, tkivu i krvnim sudovima parotidne pljuvačne žlezde zdravih osoba

* $P < 0,05$ koncentracija ACE vs ACE2 u ispitivanim tkivima (Mann-Whitney test)

$P < 0,05$ Koncentracija ACE, odnosno ACE2 između ispitivanih tkiva (Kruskal-Wallis Test praćen Mann-Whitney testom)

7. KONCENTRACIJE AT₁ RECEPTORA U TKIVU I KRVNIM SUDOVIMA PAROTIDNE ŽLEZDE ZDRAVIH OSOBA

U Tabeli 13 prikazane su koncentracije AT₁ receptora u tkivu i krvnim sudova parotidne pljuvačne žlezde zdravih osoba. U krvnim sudovima koncentracija receptora je bila značajno veća u odnosu na njihovu količinu u tkivu žlezde.

Tabela 13 Koncentracije AT₁ receptora (ng/ml) u tkivu i krvnim sudovima parotidne pljuvačne žlezde zdravih osoba

Parotidna pljuvačna žlezda	Koncentracije AT₁ receptora (ng/ml) srednja vrednost±SD
Tkivo (N=20)	82,16±9,11
Krvni sudovi (N=6)	116,92±3,18*

* $P < 0,05$ krvni sudovi vs tkivo (Studentov T test za nezavisne uzorke)

8. KONCENTRACIJE eNOS I iNOS U UKUPNOJ NESTIMULISANOJ PLJUVAČKI PACIJENATA NA TERAPIJI ENALAPRILOM I ZDRAVIH OSOBA

Koncentracije eNOS u UNP (prikupljena jedan sat pre i četiri sata posle primene jutarnje terapijske doze enalapрила) kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika prikazane su u Tabeli 14. U odnosu na zdrave učesnike, nisu zabeležene značajne razlike u koncentracijama eNOS u pljuvački prikupljenoj 1 sat pre primene enalapрила kako pacijenata sa hipertenzijom, tako i pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i pljuvački prikupljenoj 4 sata posle primene enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom. U pljuvački prikupljenoj 4 sata posle primene enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 zabeležene su značajno veće koncentracije eNOS u odnosu na kontrolnu grupu ($P=0,001$).

Poređenjem koncentracija eNOS u UNP u odnosu na vreme primene enalapрила nisu zabeležene značajne razlike, kako kod pacijenata sa hipertenzijom, tako i pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 (Tabela 14).

Tabela 14 Koncentracije eNOS (ng/ml) u UNP pre i posle primene enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika

Grupe učesnika	Koncentracije eNOS (ng/ml)		**P- vrednost
	srednja vrednost±SD		
Zdravi učesnici (N=16)	1,63±0,72		
	1h pre primene enalapрила	4h posle primene enalapрила	
Pacijenti sa hipertenzijom (N=16)	2,08±0,96	2,14±0,42	0,822
Pacijenti sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 (N=16)	1,94±0,71	2,66±0,95*	0,062
*P- vrednost	0,282	<0,001	

* $P < 0,05$ pacijenti na terapiji enalaprilom vs zdravi učesnici (One-way ANOVA praćena Bonferroni Testom)

** $P < 0,05$ 1h pre vs 4h posle primene enalapрила (Student t test za vezane uzorke)

U Tabeli 15 prikazane su koncentracije iNOS u UNP (prikupljena jedan sat pre i četiri sata posle primene jutarnje terapijske doze enalapрила) kod pacijenata na terapiji ovim lekom - pacijenti sa hipertenzijom bez DM tip 2 i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika. U odnosu na zdrave učesnike, nisu zabeležene značajne razlike u koncentracijama iNOS kod pacijenata sa hipertenzijom, kao i pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kako pre, tako i posle primene enalapрила.

Poređenjem koncentracija iNOS u UNP u odnosu na vreme primene enalapрила nisu zabeležene značajne razlike, kako kod pacijenata sa hipertenzijom, tako i pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 (Tabela 15).

Tabela 15 Koncentracije iNOS (ng/ml) u UNP pre i posle primene enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i kod zdravih učesnika

Grupe učesnika	Koncentracije iNOS (ng/ml)		**P- vrednost
	srednja vrednost±SD		
Zdravi učesnici (N=16)	1,12±0,76		
	1h pre primene enalapрила	4h posle primene enalapрила	
Pacijenti sa hipertenzijom (N=16)	1,16±0,64	0,94±0,27	0,154
Pacijenti sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 (N=16)	0,99±0,41	0,95±0,19	0,743
*P- vrednost	0,735	0,502	

*P < 0,05 pacijenti na terapiji enalaprilom vs zdravi učesnici (One-way ANOVA)

**P < 0,05 1h pre vs 4h posle primene enalapрила (Student t test za vezane uzorke)

Komparativna analiza koncentracija eNOS i iNOS u UNP pljuvački pokazala je da kod zdravih učesnika nema razlike između njihovih koncentracija ($P=0,061$).

Značajno niže koncentracije iNOS ($P \leq 0,001$), u odnosu na koncentracije eNOS, bile su prisutne u UNP kod pacijenata sa hipertenzijom, kao i pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kako pre, tako i posle primene enalapрила.

DISKUSIJA

Rezultati ove komparativne, randomizovane studije preseka sa statistički potvrđenom snagom studije se odnose na efekte enalapрила, ACE inhibitora, na funkciju pljuvačnih žlezda kod pacijenata sa hipertenzijom i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2, kao i bliže mehanizme uključene u ove efekte.

Analiza demografskih karakteristika ispitivane populacije u jednoj ovakvoj studiji preseka treba da ukaže na odnos zdravlja ili bolesti i drugih promenljivih uzimajući u obzir njihovo prisustvo u reprezentativnom uzorku u određenom vremenu. Demografske karakteristike randomizovanih učesnika pokazuju da je 30,5% ispitanika bilo bez hipertenzije, 53,3% sa hipertenzijom i 16,2% sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2. U okviru grupe učesnika studije sa hipertenzijom njih 23,3% imalo je hipertenziju udruženu sa DM tip 2. Ovo je inače u saglasnosti sa epidemiološkim podacima koji pokazuju da u populaciji pacijenata sa hipertenzijom njih oko 20% ima hipertenziju udruženu sa DM tip 2 (Contreras i sar, 2000).

Što se tiče starosti, dobijeni rezultati pokazuju da je prosečna starost zdravih učesnika statistički značajno manja od starosti pacijenata sa hipertenzijom sa ili bez DM tip 2. Međutim, imajući u vidu da je prosečna starost zdravih učesnika 57 godina, a onih sa hipertenzijom sa i bez DM tip 2 oko 63 godine, donekle se može smatrati da je ispitivana grupa homogena. Isto tako treba imati u vidu i činjenicu da se prevalenca, kako hipertenzije, tako i DM tip 2, povećava sa starošću, kao i da je starenje glavni faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih oboljenja (Barbagallo i sar, 1997; Lakatta i Levy, 2003; Lakatta i Levy, 2003; Lakatta, 2003).

U odnosu na pol u celoj populaciji učesnika statistički značajno više ima žena (oko 60%) u odnosu na muškarce (oko 40%). Prema podacima Američkog udruženja za srce o prevalenci hipertenzije u odnosu na pol i starost, do 45 godine hipertenzija je češća kod muškaraca, između 45 i 64 godine se izjednačava među polovima, dok je posle 64 godine značajno češća kod žena (Go i sar, 2013). S obzirom na ovaj podatak, kao i naše rezultate da je hipertenzija češća kod žena prosečne starosti oko 63 godine zapažene razlike mogu se pripisati razlikama između ispitivanih populacija.

U okviru grupe učesnika sa hipertenzijom sa i bez DM tip 2 zapaža se homogenost u odnosu na trajanje antihipertenzivne terapije i trajanje DM tip 2 – oko 9 godina.

Pljuvačka predstavlja najvažniju komponentu u mehanizmima oralne homeostaze. Smanjena količina ove jedinstvene i kompleksne tečnosti predstavlja rizik za pojavu ozbiljnih oralnih komplikacija koje mogu da naruše ne samo oralno zdravlje, već i zdravlje uopšte (Norlén i sar, 1991; Atkinson i sar, 2005). Poznato je da je najčešći uzrok smanjene funkcije pljuvačnih žlezda primena lekova (Porter i sar, 2004; Scully i Bagan, 2004). Smanjena funkcija pljuvačnih žlezda može se ispoljiti subjektivno kao kserostomija i objektivno kao smanjeno lučenje pljuvačke, dva fenomena koja se mogu javiti udruženo ili posebno. Naime, osećaj suvoće usta nije uvek u vezi sa hiposalivacijom, stoga što normalno izlučena pljuvačka može da isparava i dovede do osećaja suvoće kod osoba koje dišu na usta. Kserostomija nastala zbog smanjene sekrecije pljuvačke može biti praćena nepromenjenom oralnom sluznicom ili sa pratećom atrofijom sluznice i drugim promenama u usnoj duplji – prava kserostomija, dok osobe sa normalnom funkcijom pljuvačnih žlezda koje imaju osećaj kserostomije nemaju pomenute objektivne znake – lažna kserostomija (Kaczmarek, 2007). Imajući u vidu naše rezultate koji pokazuju pozitivnu korelaciju između kserostomije i niskog stepena salivacije, kserostomija praćena u ovoj studiji pripada grupi prave kserostomije koja je praćena rizikom od pojave oralnih promena.

Rezultati ove studije pokazuju da kod pacijenata sa hipertenzijom enalapril ne prouzrokuje statistički značajnu kserostomiju u odnosu na zdrave učesnike. Ovi rezultati su u saglasnosti sa velikom kliničkom studijom, na preko 500 kardiovaskularnih pacijenata o oralnim neželjenim efektima kardiovaskularnih lekova gde je pokazano da ACE inhibitori, nasuprot ostalim kardiovaskularnim lekovima, prouzrokuju statistički neznačajnu kserostomiju (Habbab i sar; 2010).

S druge strane, dobijeni rezultati pokazuju da je kod pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 na terapiji enalaprilom značajno veća učestalost kserostomije u odnosu na zdrave učesnike. Šta više, binarna logistička regresiona analiza je pokazala da je DM tip 2 nezavistan faktor rizika za razvoj kserostomije. Nakon udruživanja sa drugim ovde utvrđenim nezavisnim faktorom rizika za razvoj kserostomije - nizak

stepen salivacije, uočen je potencirajući efekat DM tip 2. Ovi rezultati su u saglasnosti sa studijom Habbab i sar (2010), u kojoj je uočena veća frekvencija kserostomije kod kardiovaskularnih pacijenata sa dijabetesom.

Metodološki, protok pljuvačke može se meriti u uslovima kada pljuvačne žlezde nisu stimulirane - protok ukupne nestimulirane pljuvačke, ili u stimuliranim uslovima, kao protok ukupne stimulirane pljuvačke. U našem istraživanju smo merili protok ukupne nestimulirane pljuvačke jer je pokazano da se tokom 24 sata funkcija pljuvačnih žlezda većim delom odvija u nestimuliranim uslovima, kao i da protok ukupne nestimulirane pljuvačke u odnosu na protok ukupne stimulirane pljuvačke predstavlja bolji prediktor subjektivnog osećaja suvoće usta, čak i kada je taj osećaj blag (Wang i sar, 1998). Dobijeni rezultati pokazuju da je protok ukupne nestimulirane pljuvačke kod pacijenata sa hipertenzijom na terapiji enalaprilom nepromenjen u odnosu na protok kod zdravih učesnika. Šta više, Nederfors i sar (1995) su pokazali da kaptopril nakon sedmodnevne primene u placebo kontrolisanoj studiji na zdravim volonterima, povećava protok, kako nestimulirane, tako i stimulirane pljuvačke, u odnosu na placebo.

Dobijeni rezultat da je kod pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 na terapiji enalaprilom značajno smanjen protok ukupne nestimulirane pljuvačke u odnosu na zdrave učesnike ukazuje više na ulogu DM tip 2 nego enalaprila u nastanku ovog efekta. Nakon binarne logističke regresione analize rezultati pokazuju da DM tip 2 predstavlja faktor rizika za razvoj smanjenog protoka ukupne nestimulirane pljuvačke, kako nezavisno, tako i udružen sa drugim nezavisnim faktorom – pol (ženski).

Imajući sve ovo u vidu naši rezultati ukazuju da je za pojavu kserostomije i smanjenog protoka ukupne nestimulirane pljuvačke kod pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 odgovoran DM tip 2, a ne enalapril.

U literaturi postoje značajna neslaganja u vezi odnosa DM i protoka pljuvačke. Tako na primer, Streckfus i sar (1994) su pokazali niže koncentracije ukupnih proteina, ali ne i nivoa elektrolita i protoka stimulirane parotidne pljuvačke kod pacijenata sa DM. Vasconcelos i sar (2010) su pokazali da DM tip 2 značajno smanjuje ukupnu nestimuliranu, kao i stimuliranu pljuvačku. S druge strane, Malicka i sar (2014) su kod

pacijenata sa DM tip 1 i 2 pokazali promene u nivou ukupnih proteina, mijeloperoksidaze i sIgA u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački, kao i veću frekvencu kserostomije, a smanjen protok pljuvačke samo kod pacijenata sa DM tip 1 u odnosu na zdrave ispitanike. Različita objašnjenja postoje za uzrok mogućeg smanjenja protoka pljuvačke kod dijabetičnih pacijenata. Carda i sar (2006) smatraju da je smanjenje protoka pljuvačke u uslovima DM izazvano povećanom diurezom koja značajnim smanjenjem ekstraćelijske tečnosti direktno utiče na stvaranje pljuvačke. Kao rezultat metaboličkih poremećaja, DM često prouzrokuje hormonske, mikrovaskularne i poremećaje na nervima koji kompromituju funkcionalnost različitih organa (Chavez i sar, 2000). Mikrovaskularne promene mogu značajno da kompromituju sposobnost pljuvačnih žlezda da reaguju na nervnu ili hormonsku stimulaciju. Tako, na primer, Roganović i sar (2011) su pokazali da je smanjen vazodilatatorni efekat ACh na izolovanoj parotidnoj arteriji (dovodna arterija za parotidnu žlezdu) kunića sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom posledica endotelne disfunkcije izazvane dijabetesom.

Postoje podaci da su antihipertenzivni lekovi, koji se propisuju za kontrolu esencijalne hipertenzije ili hipertenzije kao komplikacije drugih bolesti, kao što je DM, među najčešće propisivanim lekovima i da većina njih smanjuje funkciju pljuvačnih žlezda (Bian i sar, 2010; Smith i Burtner, 1994; Gu i sar, 2012). Imajući u vidu i činjenicu da protok krvi značajno utiče na sekreciju pljuvačke, mehanizmi kojim antihipertenzivni lekovi utiču na funkciju pljuvačnih žlezda leže u njihovom antihipertenzivnom delovanju: smanjen minutni volumen i smanjena količina ekstraćelijske tečnosti. Studija Djukić i sar (2015) o efektima antihipertenziva prve linije na funkciju pljuvačnih žlezda pokazuje da metoprolol, selektivni beta1 blokator, u odnosu na druge ispitivane kombinacije antihipertenziva (enalapril sa metoprololom i/ili hidrohlorotiazidom – tiazidni diuretik) u najvećoj meri izaziva kserostomiju i smanjenje protoka ukupne nestimulisane pljuvačke. Statističkom analizom autori su pokazali da metoprolol, šta više, predstavlja nezavistan faktor rizika za nastanak kserostomije. De Matos i sar (2010) su pokazali da beta blokatori, kao grupa lekova, smanjuju protok ukupne nestimulisane pljuvačke u odnosu na zdrave ispitanike. Ispitujući efekat metoprolola na sekreciju pljuvačke kod pacijenata sa hipertenzijom, Nederfors i Dahlöf (1996) su zapazili značajno povećanje protoka nakon ukidanja leka, kao i značajno

zmanjenje nakon njegovog ponovnog uvođenja. Autori smatraju da su povećan minutni volumen praćen povećanjem protoka krvi u pljuvačnim žlezdama, tokom ukidanja metoprolola i suprotan efekat tokom ponovnog uvođenja leka, odgovorni za uočene promene u protoku pljuvačke. Takođe, još jedan mehanizam može biti odgovoran za smanjenu funkciju pljuvačnih žlezda tokom primene beta blokatora, a to je prevencija ushodne regulacije $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ kotransportera (praćena velikim ulaskom Cl^- u acinusne ćelije i posledičnom povećanom sekrecijom ovog jona i tečnosti u pljuvačnim žlezdama) preko blokade beta1 adrenoceptora (Paulais i Turner, 1992).

Što se tiče tiazidnih diuretika, kod pacijenata sa hipertenzijom na terapiji hidrohlorotiazidom u prisustvu spironolaktona, diuretika koji štedi kalijum, uočeno je značajno smanjenje protoka stimulisane parotidne pljuvačke u odnosu na zdrave ispitanike i pacijente sa hipertenzijom bez terapije (Streckfus i sar, 1994). Umereno smanjenje protoka pljuvačke je uočeno nakon sedmodnevne primene bendroflumetiazida (tiazidni diuretik sličan hidrohlorotiazidu) u studiji na zdravim volonterima (Nederfors i sar, 2004). Djukić i sar (2015) su u studiji na pacijentima sa hipertenzijom pokazali da kombinacija hidrohlorotiazida sa enalaprilom, kao i metoprololom, prouzrokuje, kako kserostomiju, tako i smanjen protok pljuvačke. Kako enalapril nije menjao značajno funkciju pljuvačnih žlezda autori su zaključili da hidrohlorotiazid ima kserogeni efekat iako niko od učesnika u ovoj studiji nije uzimao hidrohlorotiazid kao monoterapiju. Izgleda da antihipertenzivni mehanizam dejstva hidrohlorotiazida, inhibicija $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ kotransporta, nije uključen u njegov kserogeni efekat, jer acinusne ćelije ne poseduju $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ kotransporter (Turner i Sugiya, 2002), dok vazodilatacija doprinosi salivarnoj sekreciji (Edwards, 1998). Najverovatnije, stoga hidrohlorotiazid ostvaruje efekat na salivarnu sekreciju preko inhibicije transporta HCO_3^- usled inhibicije karbonil anhidraze koja ostvariye svoje dejstvo u acinusnim ćelijama (Turner i Sugiya, 2002).

Glavni razlog za kserogeni efekat (kserostomija i smanjen protok pljuvačke) većine antihipertenzivnih lekova leži u njihovom antihipertenzivnom delovanju – smanjen minutni volumen i sledstveno smanjen priliv krvi u pljuvačne žlezde koji značajno doprinosi smanjenju sekrecije pljuvačke. Imajući u vidu naše rezultate da

enalapril nema kserogeni efekat, a efikasan je antihipertenziv, od interesa je bilo ispitati u kojoj meri njegovi mehanizmi antihipertenzivnog, kao i protektivnog delovanja doprinose izostanku pomenutog neželjenog efekta. U vezi sa tim, u ovom radu ispitivani su elementi angiotenzinskog sistema, kao i elementi protektivnog dejstva enalapрила – antioksidativni status i enzimi koji stvaraju NO u fiziološkim odnosno patološkim uslovima, eNOS i iNOS, na nivou parotidne žlezde i ukupne nestimulisane pljuvačke čoveka.

Za analizu prisustva elemenata angiotenzinskog sistema u tkivu parotidne pljuvačne žlezde u studiji je korišćeno samo zdravo tkivo parotidne žlezde, kao i žlezdani krvni sudovi, od pacijenata kod kojih je bila indikovana parotidektomija zbog prisustva benignih tumora, a koji inače nisu imali sistemska oboljenja. Ovo stoga što je u populaciji pacijenata sa benignim tumorima parotidne žlezde koji su operisani na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju, Stomatološkog fakulteta u Beogradu bio zanemarljiv broj onih koji su imali hipertenziju sa ili bez DM tip 2 i bili na monoterapiji enalaprilom. Poznato je da se ACE, enzimske i neenzimske komponente redoks homeostaze, kao i različite izoforme NOS, nalaze u slobodnom obliku u različitim tkivnim tečnostima (Kawajiri i sar, 2009; Mizuiri i sar, 2011; Kędziora-Kornatowska i sar, 2006; Chan i sar, 2012). Imajući u vidu činjenicu da se o prisustvu pomenutih komponenti u pljuvački malo zna, pored tkiva pljuvačne žlezde uzimani su i uzorci pljuvačke zdravih i pacijenata sa hipertenzijom sa ili bez DM tip 2 na terapiji enalaprilom za analizu ovih elemenata.

Glavni farmakodinamski efekat ACE inhibitora je inhibicija ACE koja konvertuje Ang I u Ang II (snažan vazokonstriktor koji oslobađa i aldosteron) i metaboliše bradikinin koji je inače snažan vazodilatator. Dakle, antihipertenzivni efekat enalapрила je posledica vazodilatacije i pada perifernog otpora usled nedostatka Ang II i porasta bradikinina, kao i smanjenog minutnog volumena usled smanjene retencije natrijuma i vode – efekat smanjenja aldosterona.

Naši rezultati, dobijeni imunoesejskom analizom, pokazuju da je ACE prisutna, kako u tkivu, tako i krvnim sudovima parotidne žlezde zdravih osoba, i to u koncentraciji $5,00 \pm 1,92$ ng/ml, odnosno $4,18 \pm 3,52$ ng/ml. U ukupnoj nestimulisanoj pljuvački zdravih osoba ACE je prisutna u koncentraciji od $7,02 \pm 11,96$ ng/ml, a kod

pacijenata na terapiji enalaprilom, sa hipertenzijom u količini od $4,67 \pm 1,49$ ng/ml, a hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 u količini od $4,25 \pm 2,60$ ng/ml.

Poznato je da ACE u slobodnom obliku u plazmi potiče primarno iz endotelnih ćelija (Beldent i sar, 1995; Parvathy i sar, 1997; Woodman i sar, 2000). Ovaj slobodni oblik ACE odvaja se iz tkivno vezane ACE procesom proteolize pod dejstvom proteaza (dezintegrin metaloproteinaza) ADAM9 (English i sar, 2012). Kako vezani, tako i slobodni oblik ACE konvertuju Ang I u Ang II, ali u različitom stepenu (van Esch i sar, 2005), i smatra se da proces oslobađanja slobodne ACE omogućuje nishodnu regulaciju (smanjenje) aktivnosti i/ili količine tkivne ACE (Votta-Velis i sar, 2007). Pokazano je da je endotoksinom izazvano oštećenje endotela u krvnim sudovima pluća praćeno povećanjem koncentracije ACE u plazmi, a smanjenjem u tkivu (Votta-Velis i sar, 2007). Hara i sar (2001) su pokazali na eksperimentalnom modelu hipertenzije da ACE inhibitori efikasno smanjuju povećanu ekspresiju ACE u hipertenziji. S obzirom da naši rezultati pokazuju da nema statistički značajne razlike između količine tkivnog ACE kod zdravih osoba i ACE u pljuvački kod zdravih i hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 na terapiji enalaprilom može se pretpostaviti da enalapril i u pljuvački efikasno smanjuje povećanje ACE izazvano hipertenzijom. Činjenica da je efekat enalaprila u minimalnim (1 sat pre primene) i maksimalnim (4 sata posle primene) koncentracijama na koncentracije ACE isti u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 ukazuje da enalapril i u minimalnim koncentracijama podjednako efikasno, kao i u maksimalnim, snižava hipertenzijom i/ili DM izazvano povećanje koncentracija ACE. Farmakokinetička činjenica da na kraju doznog perioda enalaprila, kada se koncentracije u krvi smanjuju, dva faktora su značajna za funkcionalnu inhibiciju tkivnog ACE: afinitet i tkivno zadržavanje ACE inhibitora (Dzau i sar, 2001), ukazuje da tkivo parotidne žlezde čoveka ima izraziti afinitet i tkivno zadržavanje enalaprila. Ovi farmakokinetički i farmakodinamski podaci o enalaprilu na nivou parotidne žlezde čoveka su po prvi put u svetu pokazani u ovom radu.

Interesantan je podatak koji ukazuje na prisustvo endogenih ACE inhibitora u serumu, ali ne i u tkivima ljudi, koji inhibišu cirkulišući ACE i pokazuju efekat sličan onom koji izazivaju ACE inhibitori kao lekovi (Klauser i sar, 1979; Ryan i sar, 1979). Najveći broj dosadašnjih podataka koji se odnose na „nivo“ ACE dobijen je merenjem

aktivnosti ACE, umesto koncentracije ACE. Zbog prisustva endogenog inhibitora ACE u serumu ovi rezultati obično pokazuju visok „nivo“ ACE u tkivima i nizak u serumu (Fagyas i sar, 2014). U našem radu mi smo određivali koncentraciju, a ne aktivnost ACE, i kako je ta koncentracija u tkivu parotidne žlezde i ukupnoj nestimulisanoj pljuvački približno ista kod zdravih ljudi teško je reći da li i pljuvačka sadrži ove endogene ACE inhibitore za koje se inače smatra da neutrališu ACE u serumu da bi njegova fiziološka uloga u tkivima bila očuvana (Fagyas i sar, 2014).

Na široku rasprostranjenost ACE u humanim tkivima u različitim koncentracijama ukazano je već ranije. Tako, na primer, Miners i sar (2009) su pokazali imunosejskom metodom da je ACE prisutna i u moždanom tkivu, i to u koncentraciji od 7,87 ng/ml, dok su Fagyas i sar (2014) pokazali da je ACE u serumu prisutna u količini od 90 do 160 ng/ml. Poredeći naše rezultate sa rezultatima studija Miners i sar (2009) i Fagyas i sar (2014), nivo ACE u parotidnoj žlezdi je oko 1,5 puta manji u odnosu na izmeren nivo u moždanom tkivu, i čak 18 – 32 puta manji nego u serumu. S druge strane, Tipnis i sar (2000) su primenom Northern blot tehnike merili ekspresiju ACE u 15 humanih tkiva i pokazali da je ACE u najvećim koncentracijama prisutna u plućima i bubregu, tako da ova tkiva predstavljaju glavno izвориšte ACE.

Na fiziološki značaj našeg rezultata o prisustvu ACE u tkivu parotidne žlezde čoveka ukazuje i nalaz da su AT₁ receptori, čiji je agonist Ang II – produkt ACE, prisutni u parotidnoj žlezdi čoveka. U ovom radu je pokazano da su AT₁ receptori statistički više prisutni u krvnim sudovima nego u tkivu parotidne pljuvačne žlezde zdravih osoba (116,92±3,18 ng/ml, odnosno 82,16±9,11 ng/ml). Ovo potvrđuje da Ang II svoj glavni efekat, vazokonstrikciju, kao što je to slučaj u mnogim drugim krvnim sudovima (Lin i sar, 2014; Ueda i sar, 2000) ostvaruje i na nivou krvnih sudova parotidne pljuvačne žlezde čoveka.

Činjenica da nema statistički značajne razlike u koncentraciji ACE u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački zdravih učesnika i hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 na terapiji enalaprilom ukazuje da enalapril efikasno inhibiše povećan ACE u hipertenziji (Yang i sar, 2013) i da je nivo Ang II i njegov vazokonstriktorni efekat u parotidnoj žlezdi čoveka smanjen, što je jedan od razloga za povećan protok krvi kroz parotidnu žlezdu i sledstveni izostanak kserogenog efekta enalaprila kod pacijenata sa

hipertenzijom. Takođe, razlog za povećan protok krvi kroz parotidnu žlezdu i sledstveni izostanak kserogenog efekta enalapрила kod pacijenata sa hipertenzijom može biti i činjenica da je zbog efikasne inhibicije povećanog ACE enalaprilom u hipertenziji enalaprilom inhibisan i metabolizam bradikinina, snažnog vazodilatatora. S tim u vezi interesantan je nalaz da kaptopril i bradikinin značajno potenciraju sekreciju submandibularne pljuvačne žlezde mačke izazvanu električnom stimulacijom chorde tympani i da efekat izostaje u prisustvu antagoniste kininskih B₂ receptora i kombinacije neselektivnog NOS i ciklooksigenaznog inhibitora (Stojić, 1999). Ovi rezultati pokazuju da kaptopril potencira salivaciju izazvanu stimulacijom chorde tympani preko endogeno nakupljenog bradikinina koji aktivira kininske B₂ receptore, a čiji je transdukcioni signal povećanje NO i prostaciklina. Kako su NO i prostaciklin snažni vazodilatatori to lokalno povećanje protoka krvi kroz pljuvačnu žlezdu je najznačajniji faktor u potenciranju lučenja pljuvačke pod dejstvom kaptoprila i bradikinina (Stojić, 1999). Ovi rezultati su potvrdili pretpostavku Nederfors i sar (1995) da je povećanje protoka pljuvačke kod ljudi tokom primene kaptoprila najverovatnije posledica lokalnog povećanja protoka krvi kroz pljuvačne žlezde. Imajući sve ovo u vidu, naš nalaz – prisustvo kserogenog efekta kod hipertenzivnih pacijenata sa DM tip 2 na terapiji enalaprilom može se pripisati promenjenoj funkciji pljuvačnih žlezda pod dejstvom DM tip 2, a ne enalapрила.

Poznato je da tkiva i tkivne tečnosti čoveka sadrže homolog ACE – ACE2, koji konvertuje snažan vazokonstriktor Ang II u vazodilatatorni peptid Ang (1-7) koji smanjuje oksidativni stres i stimuliše natriurezu (Iusuf i sar, 2008; Ferrario i Varagic, 2010). Inače, iako ACE2 nije supstrat za delovanje ACE inhibitora u njihovom prisustvu povećana je njegova ekspresija i aktivnost (Yang i sar, 2013; Ferrario i sar, 2005). Naši rezultati pokazuju da su koncentracije ACE2 u tkivu parotidne pljuvačne žlezde zdravih osoba značajno veće nego u njenim krvnim sudovima ($6,51 \pm 1,22$ ng/ml vs $2,70 \pm 1,33$ ng/ml). Koncentracija ACE2 u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački zdravih osoba iznosi $0,08 \pm 0,04$ ng/ml, a pacijenata na terapiji enalaprilom sa hipertenzijom $0,21 \pm 0,10$ ng/ml, i hipertenzijom udruženom sa DM tip 2 $0,14 \pm 0,08$ ng/ml. ACE2, za razliku od ACE, lokalizovan je u ograničenom broju tkiva, srce, bubrezi, testisi i gastrointestinalni trakt (Tipnis i sar, 2000; Donoghue i sar, 2000; Harmer i sar, 2002). Naši rezultati, po prvi put pokazuju da se u ova ograničena tkiva može ubrojati i

parotidna žlezda čoveka. Na nivou bubrega pokazano je da se ACE2 iz tkiva bubrega oslobađa u mokraću pod dejstvom proteaze ADAM17 (Lambert i sar, 2005; Mizuiri i sar, 2011). Naša statistička analiza je pokazala da je koncentracija ACE2 značajno manja u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački, kako zdravih, tako i pacijenata na terapiji enalaprilom u odnosu na koncentracije u tkivu parotidne žlezde i njenim krvnim sudovima zdravih učesnika. Razlog za postojanje ove razlike među tkivne ACE2 i slobodne ACE2 u pljuvački, bar kod zdravih učesnika, za sada je nepoznat jer još uvek nema podataka u literaturi o kontroli odnosa između tkivnog i slobodnog ACE2 u drugim tkivima. Interesantan je podatak da statistička analiza takođe pokazuje da je koncentracija ACE2 u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački veća kod hipertenzivnih pacijenata na terapiji enalaprilom, 1 sat pre i 4 sata posle terapije i hipertenzivnih pacijenata sa DM tip 2 pre terapije, a sa trendom povećanja kod hipertenzivnih pacijenata sa DM tip 2 posle terapije, u odnosu na zdrave učesnike. Imajući u vidu činjenicu da ACE inhibitori povećavaju ekspresiju i aktivnost ACE2 na animalnom modelu srčanog tkiva (Yang i sar, 2013) može se pretpostaviti da je zapažena razlika u pljuvački zdravih učesnika i hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 na terapiji enalaprilom posledica delovanja enalaprila. Takođe, naš rezultat da je efekat enalaprila u minimalnim i maksimalnim koncentracijama na koncentracije ACE2 isti u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 ukazuje da enalapril i u minimalnim koncentracijama podjednako efikasno, kao i u maksimalnim, povećava koncentracije ACE2.

S druge strane, podatak da je nivo ACE2 u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački pacijenata sa hipertenzijom sa i bez DM tip 2 na terapiji enalaprilom statistički značajno veći u odnosu na zdrave ispitanike značajan je za analizu činjenice da enalapril nema kserogeni efekat. To znači da naši rezultati indirektno ukazuju da enalapril efikasno povećava u tkivu parotidne žlezde Ang (1-7), a što je praćeno vazodilatacijom i sledstvenim povećanjem protoka krvi kroz parotidnu žlezdu čoveka.

Oksidativni stres predstavlja poremećenu ravnotežu između stvaranja slobodnih radikala i kompenzatornog odgovora endogene antioksidativne zaštite. Antioksidativno dejstvo enalaprila, posledica je njegovog indirektnog efekta - smanjeno stvaranje slobodnih radikala i sledstveno smanjen utrošak antioksidanasa, kao i direktnog efekta -

povećanje koncentracije i aktivnosti antioksidanasa (neenzimskih i enzimskih) u različitim humanim i tkivima životinja (Donmez i sar, 2002; Deoghare i Kantharia, 2013; de Cavanagh i sar, 2000). U kojoj meri protektivno antioksidantno dejstvo enalapрила doprinosi izostanku kserogenog efekta ispitali smo, na nivou ukupne nestimulisane pljuvačke, preko indikatora oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod hipertenzivnih pacijenata sa ili bez DM tip 2.

MDA je jedan od indirektnih indikatora oksidativnog stresa i produkt je oksidativnog oštećenja lipida (lipidna peroksidacija) (Halliwell i Gutteridge, 1999). MDA nastaje enzimskom i neenzimskom razgradnjom u najvećoj meri polinezasićenih masnih kiselina, kao i arahidonske kiseline (Esterbauer i sar, 1991). U organizmu MDA se nalazi kao slobodni molekul ili vezan sa proteinima ili nukleinskim kiselinama i oba oblika ove molekule su toksična (Carbonneau i sar, 1991). U principu, koncentracija i perzistencija vezane frakcije MDA u tkivu je veća u odnosu na slobodni MDA (Siu i Draper, 1982). Tako, na primer, na nivou plazme zdravih osoba pokazano je da vezana frakcija MDA čini od 83% do 92% ukupnog MDA (Hong i sar, 2000; Carbonneau i sar, 1991). Rezultati naše studije pokazuju da je koncentracija MDA vezanog za proteine ukupne nestimulisane pljuvačke zdravih osoba $745,62 \pm 680,05$ pmol/mg.

In vitro studije pokazuju da je proces vezivanja MDA za proteine ubrzan kada su ti proteini već modifikovani procesom neenzimske glikolizacije, što je slučaj u dijabetesu (Mooradian i sar, 1996). S druge strane, u kliničkim uslovima je pokazano da raste nivo MDA koji je vezan za proteine plazme kakav je lipoprotein male gustine (LDL) kod pacijenata sa DM tip 2 (Kotani i sar, 2015). Naši rezultati pokazuju da je koncentracija MDA vezanog za proteine pljuvačke kod hipertenzivnih pacijenata sa ili bez DM tip 2 četiri sata nakon primene enalapрила značajno manja u odnosu na zdrave učesnike. Pokazano je da enalapril u plazmi pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom (Deoghare i Kantharia, 2013), kao i u tkivu srca, bubrega i jetre kod pacova sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom (de Cavanagh i sar, 2001) smanjuje nivo MDA. Imajući sve ovo u vidu može se pretpostaviti da enalapril i u pljuvački smanjuje povećane koncentracije MDA vezanog za proteine izazvane hipertenzijom i/ili DM. Međutim, činjenica da enalapril u maksimalnim koncentracijama smanjuje koncentracije MDA vezanog za proteine na koncentracije značajno niže od onih kod zdravih učesnika ukazuje da je MDA vezan za proteine povećan kod ovih učesnika

najverovatnije zbog prisustva periodontitisa. Naime, kliničke studije pokazuju da je u pljuvački pacijenata sa periodontitisom povećan oksidativni stres i njegov marker MDA (Akalin i sar, 2007). Stoga, enalapril kod hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2, koji su sličnog parodontološkog statusa kao i zdravi, efikasno smanjuje i periodontitisom izazvano povećanje koncentracija MDA vezanog za proteine. Činjenica da se koncentracije vezanog MDA u pljuvački hipertenzivnih pacijenata sa ili bez DM tip 2 u minimalnim koncentracijama enalapрила značajno ne razlikuju od onih kod zdravih učesnika ukazuje da su koncentracije enalapрила u tom trenutku možda nedovoljne za potpuni pomenuti antioksidativni efekat.

Elementi mehanizma kojim enalapril smanjuje oksidativni stres preko lipidne peroksidacije i njenog produkta MDA su sledeći. Smatra se da je ovaj efekat enalapрила najverovatnije posledica smanjene koncentracije Ang II koja dovodi do smanjene aktivnosti NADPH oksidaze, smanjene koncentracije slobodnih radikala i sledstvene inhibicije lipidne peroksidacije (Hosomi i sar, 2001; Deoghare i Kantharia, 2013). S druge strane, naši rezultati ukazuju i na drugu mogućnost. Imajući u vidu da je koncentracija ACE2 u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački hipertenzivnih pacijenata sa ili bez DM tip 2 na terapiji enalaprilom povećana u odnosu na zdrave učesnike, kao i da ACE inhibitori povećavaju koncentraciju Ang (1-7) u plazmi hipertenzivnih pacijenata (Luque i sar, 1996) ukazuje na mogućnost da i Ang (1-7) učestvuje u pomenutom efektu enalapрила. Naime, Yousif i sar (2012) su na eksperimentalnom modelu dijabetes melitisa tip 1 pokazali da Ang (1-7) inhibiše povećanu aktivnost NADPH oksidaze i sledstveno smanjuje lipidnu peroksidaciju u srčanom i bubrežnom tkivu pacova.

Dejstva antioksidanasa u biološkim sistemima, kao što je plazma, zavise od prirode oksidanasa, molekuli ili slobodni radikali, aktivnosti i koncentracije antioksidanasa, kao i njihove koordinirane/sinergističke interakcije u biološkim sistemima (Yeum i sar, 2004).

Totalni antioksidativni kapacitet, indikator antioksidativne zaštite, predstavlja rezultat sveukupne koordinirane aktivnosti prisutnih antioksidanasa (endogeni – stvorenih u organizmu, i egzogeni – nutritivnog porekla) uključenih u direktno uklanjanje slobodnih radikala (Niki, 2010). Antioksidansi mogu biti hidrofilni i lipofilni, kao slobodni ili vezani najčešće za lipoproteine. Hidrofilni antioksidansi, kao što su mokraćna kiselina, proteini i vitamin C, neutrališu slobodne radikale primarno

prisutne u vodenoj sredini (Niki, 2010). S druge strane, lipofilni antioksidansi su lokalizovani u okviru ćelijskih ili cirkulišućih lipoproteina, na površini ili duboko u lipidnom domenu. Njihova efikasnost u uklanjanju slobodnih radikala zavisi od hemijske strukture samog antioksidanasa i fizičkih karakteristika okoline u kojoj se nalaze (mobilnost antioksidansa i fluidnost okoline) (Niki, 2010).

U plazmi zdravih osoba pokazano je da najveći doprinos totalnom antioksidativnom kapacitetu ostvaruju hidrofilni antioksidansi: albumini (10-28%), mokraćna kiselina (7-58%) i vitamin C (3-27%), vitamin E (<10%) kao mešovit hidro/lipofilni, dok 30% čine lipofilni antioksidansi (karitenoidi, vitamin A) (Prior i sar, 2003). Totalnom antioksidativnom kapacitetu pljuvačke zdravih osoba u najvećoj meri, preko 80%, doprinose hidrofilni, a samo oko 13% lipofilni antioksidansi (Moore i sar, 1994; Hirayama i sar, 1997). Totalni antioksidativni kapacitet pljuvačke se razlikuje od istog u plazmi po antioksidativnom doprinosu pojedinih hidrofilih komponenti. Najveći doprinos daje mokraćna kiselina (70%), prisutna u koncentracijama sličnim kao u plazmi, dok ostatak čine albumini i vitamin C čije su koncentracije značajno niže u pljuvački nego u plazmi (Moore i sar, 1994). Ovo je u skladu sa činjenicom da pljuvačka predstavlja ultrafiltrat plazme, te da je u prelazak albumina i vitamina C iz plazme u pljuvačku uključen aktivni transport ovih molekula.

Danas postoje specifične metode za merenje totalnog antioksidativnog kapaciteta hidrofilih ili lipofilih komponenti ovog sistema. S obzirom da antioksidativni kapacitet pljuvačke u najvećoj meri (80%) čine hidrofilne komponente, mi smo za ispitivanje totalnog antioksidativnog kapaciteta pljuvačke odabrali TEAC esej (Trolox kao ekvivalent antioksidativnog kapaciteta) koji kvantifikuje hidrofilne komponente sa najvećom osetljivošću prema mokraćnoj kiselini.

Naši rezultati pokazuju da totalni antioksidativni kapacitet ukupne nestimulisane pljuvačke u jutarnjim časovima pre jela kod zdravih osoba iznosi $460 \pm 250 \mu\text{M}$. Imajući u vidu podatke da najveći doprinos totalnog antioksidativnog kapaciteta pripada mokraćnoj kiselini (Moore i sar, 1994), kao i da je primenjena metoda (TEAC) najosetljivija za mokraćnu kiselinu, može se pretpostaviti da i dobijeni rezultat za totalni antioksidativni kapacitet pljuvačke najvećim delom odražava aktivnost mokraćne kiseline. S druge strane činjenica da je uzorkovanje pljuvačke rađeno u jutarnjim

časovima pre jela može se pretpostaviti da dobijena vrednost u principu odražava samo nivo endogenih antioksidansa, ali ne i egzogenih koji inače potiču od hrane.

Dobijena vrednost za totalni antioksidativni kapacitet ($460 \pm 250 \mu\text{M}$) predstavlja apsolutnu koncentraciju antioksidanasa u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački koja je izlučena u toku 5 min. Kada se uzme u obzir izloženost gingive i zuba dejstvu antioksidanasa nije toliko značajna apsolutna količina antioksidanasa, već je mnogo značajniji njihov priliv koji inače zavisi od protoka pljuvačke (Moore i sar, 1994). Imajući to u vidu, dobijenu vrednost za totalni antioksidativni kapacitet smo izrazili kao priliv ukupnih antioksidanasa, u skladu sa studijama Moore i sar (1994) i Sculley i Langley-Evans (2003). Naši rezultati pokazuju da je kod zdravih osoba, starosti oko 57 godina, priliv ukupnih antioksidanasa $0,22 \pm 0,12 \mu\text{M}/\text{min}$. Ovaj priliv antioksidanasa je manji u odnosu na $0,52 \pm 0,20 \mu\text{M}/\text{min}$ utvrđen od strane Guentsch i sar (2008) kod zdravih osoba starosti oko 34 godine. Zapažena razlika je najverovatnije posledica različitog protoka kod dve različite starosne populacije ($0,42 \pm 0,11 \text{ ml}/\text{min}$ - oko 57 godina vs. $0,60 \pm 0,28 \text{ ml}/\text{min}$ - oko 34 godine).

Veliki broj kliničkih studija pokazuje smanjene koncentracije totalnog antioksidativnog kapaciteta plazme pacijanata sa hipertenzijom, kao i DM (Ghiadoni i sar, 2003; Onuoha i sar, 2013; Opara i sar, 1999; Rahbani-Nobar i sar, 1999; Rani i Mythili, 2014). Smatra se da je ovo smanjenje totalnog antioksidativnog kapaciteta posledica utroška antioksidanasa usled visokih koncentracija slobodnih radikala koje prate ova oboljenja (Adegor, 2010; Maxwell i sar, 1997). Naši rezultati pokazuju da je totalni antioksidativni kapacitet ukupne nestimulisane pljuvačke 1 sat pre i 4 sata posle primene enalapril (minimalne i maksimalne koncentracije) kod hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 sličan kapacitetu pljuvačke zdravih učesnika. Imajući u vidu da kliničke i studije na animalnim modelima pokazuju da ACE inhibitori povećavaju totalni antioksidativni kapacitet u hipertenziji i DM u različitim tkivima (plazma, bubrezi) (Ghiadoni i sar, 2003; Chandran i sar, 2014), može se pretpostaviti da enalapril isti efekat ostvaruje i u pljuvački. Mehanizam kojim enalapril povećava totalni antioksidativni kapacitet uključuje njegove primarne efekte, smanjenje koncentracije Ang II i povećanje koncentracije Ang (1-7) usled inhibicije ACE. Hosomi i sar (2001), Luque i sar (1996) i Yousif i sar (2012) su pokazali da smanjene koncentracije Ang II i povećane koncentracije Ang (1-7) prouzrokuju smanjenje aktivnosti NADPH oksidaze,

smanjenje koncentracije slobodnih radikala (prvenstveno superoksida za koji je poznato da predstavlja dominantan slobodni radikal u hipertenziji i DM), i sledstvenog smanjenja utroška antioksidanasa koji doprinose porastu totalnog antioksidativnog kapaciteta. Činjenica da je u prisustvu minimalnih i maksimalnih koncentracija enalapрила totalni antioksidativni kapacitet u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 sličan ukazuje da enalapril i u minimalnim koncentracijama efikasno smanjuje utrošak antioksidanasa čime doprinosi porastu totalnog antioksidativnog kapaciteta pljuvačke.

Što se tiče priliva antioksidanasa ukupnoj nestimulisanoj pljuvački kod hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 na terapiji enalaprilom, naši rezultati pokazuju sledeće. Priliv antioksidanasa u pljuvački hipertenzivnih pacijenata bez DM tip 2, jedan sat pre i 4 sata posle primene enalapрила, sličan je prilivu kod zdravih učesnika, dok je u pljuvački hipertenzivnih pacijenata sa DM tip 2, jedan sat pre i 4 sata posle primene enalapрила, značajno manji. Imajući u vidu pozitivnu korelaciju između protoka ukupne nestimulisane pljuvačke i priliva ukupnih antioksidanasa u celoj populaciji (zdravi i hipertenzivni pacijenti sa i bez DM tip 2 na terapiji enalaprilom), kao i u okviru populacije hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 na terapiji enalaprilom, može se pretpostaviti da je pozitivan efekat enalapрила na ukupni antioksidativni status kod pacijenata sa DM tip 2 smanjen zbog smanjenog protoka pljuvačke.

Glutation je jedan od elemenata neenzimske antioksidativne zaštite. Ovaj tripeptid γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicin, predstavlja glavni tiolni intraćelijski antioksidans prisutan u svim tkivima, a ponajviše u jetri, slezini, bubrezima, očnom sočivu, eritrocitima i leukocitima, u milimolarnim koncentracijama (1-10 mM) (Lu, 2013; Pastore i sar, 2003). Gotovo sav intraćelijski glutacion nalazi se u redukovanoj formi u obliku tiola - 98% (GSH), dok je ostatak u oksidisanom formi u obliku disulfida (GSSG) (Kandár, 2016). Jedno od ekstraćelijskih izvorišta glutaciona je plazma u kojoj su koncentracije glutaciona značajno niže od onih intraćelijskih – od 0,5 do 5 μ M. Najvećim delom glutacion u plazmi potiče iz jetre (Yang i sar, 1995). Aktivna antioksidativna forma glutaciona je njegov redukovani oblik – GSH, koji često neutrališe kiseonične i azotne slobodne radikale pri čemu nastaje oksidisani oblik glutaciona – GSSG (Hwanf i sar, 1992; Townsend i sar, 2003). Oksidisani glutacion se

uz aktivnost NADPH- zavisne glutacione reduktaze ponovo vraća u redukovani oblik spreman za dalje antioksidativno dejstvo (Kandár, 2016). Održavanje optimalnog odnosa redukovanog i oksidisanog oblika (GSH:GSSG) neophodan je za ćelijsko preživljavanje (Townsend i sar, 2003). Nedostatak GSH povećava rizik od oštećenja ćelija u toku oksidativnog stresa (Townsend i sar, 2003). U tom smislu disbalans GSH/GSSG zapaža se u mnogim bolestima koje uključuju hipertenziju, DM, kancer, neurodegenerativna oboljenja, cističnu fibrozu, kao i u procesu starenja (Townsend i sar, 2003).

Kao posledica povećanog oksidativnog stresa u brojnim oboljenjima zabeležene su promene u koncentracijama glutaciona koje inače variraju zavisno od oblika glutaciona koji je kvantifikovan (ukupni, redukovani, oksidovani), starosti ispitanika, vrste i težine bolesti, kao i vrste lekova uključenih u terapiju tih bolesti (Yoshida i sar, 1995; Bravi i sar, 2006; Richie i sar, 1996; Lang i sar, 2000). Tako, na primer, Redón i sar (2003) su pokazali da je u krvi pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom koji nisu prethodno bili na antihipertenzivnoj terapiji, starosti 25-50 godina, smanjena koncentracija redukovanog glutaciona, a povećana oksidovanog. U plazmi pacijenata sa nelečenom esencijalnom hipertenzijom, starosti oko 46 godina, u odnosu na zdrave, takođe su zabeležene smanjene koncentracije redukovanog glutaciona (Donmez i sar, 2002). S druge strane, u krvi hipertenzivnih pacijenata na terapiji antihipertenzivima (statini, beta blokatori, ACE inhibitori i njihove kombinacije), prosečne starosti oko 82 godine, pokazano je povećanje redukovanog glutaciona, kao i aktivnosti glutacione reduktaze, enzima koji konvertuje oksidovanu u redukovanu formu, u odnosu na zdrave (Rybka i sar, 2011; Rybka i sar, 2011). Što se tiče koncentracija glutaciona u dijabetesu, u plazmi pacijenata sa DM tip 2 i pratećom retinopatijom, prosečne starosti 71 godina, pokazano je smanjenje koncentracije ukupnog i redukovanog glutaciona u odnosu na zdrave ispitanike (Samiec i sar, 1998). U eritrocitima pacijenata sa DM tip 2 na terapiji oralnim hipoglikemicima, starosti oko 50 godina, zabeleženo je smanjenje ukupnog i redukovanog glutaciona, kao i brzine njegove sinteze (Sekhar i sar, 2011). Postoje studije u kojima nisu zabeležene promene u koncentraciji redukovanog glutaciona u krvi pacijenata sa DM tip 2 na terapiji oralnim hipoglikemicima, starosti 36-70 godina (Ozkilic i sar, 2006).

Što se tiče prisustva glutaciona u kompleksu pljuvačne žlezde – pljuvačka kod ljudi, za sada nema podataka o kvantifikaciji intraćelijskog glutaciona u pljuvačnim žlezdama, ali postoje podaci o prisustvu ekstraćelijskog glutaciona u pljuvački. Zappacosta i sar (1999) su pokazali da je koncentracija ukupnog glutaciona $1,2 \mu\text{M}$ u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački zdravih osoba starosti 30 – 50 godina. Naši rezultati pokazuju da koncentracija ukupnog glutaciona u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački zdravih osoba iznosi oko $0,09 \mu\text{M}$. Imajući u vidu već pomenutu činjenicu da koncentracija glutaciona varira u zavisnosti od starosti ispitanika zapažena razlika u koncentraciji ukupnog glutaciona u pljuvački između naše i studije Zappacosta i sar (1999) je verovatno nastala zbog uticaja ovog faktora jer je naša populacija starija (50 - 70 godina). O poreklu glutaciona u pljuvački za sada nema podataka. Imajući u vidu činjenicu da pljuvačku pored elemenata koji se stvaraju u samoj pljuvačnoj žlezdi čini i ultrafiltrat plazme interesantan je podatak da je koncentracija mokraćne kiseline u plazmi i pljuvački (gde predstavlja najveći i najznačajniji element antioksidativnog profila) približno ista (Roth i Calmes, 1981) što navodi na zaključak da je mokraćna kiselina u pljuvački poreklom samo iz plazme, a ne i iz tkiva pljuvačnih žlezda. Utvrđeno je da je glutation sintetaza – enzim koji sintetiše glutation, prisutan u kulturi humanih ćelija pljuvačnih žlezda (Prins i sar, 2014), kao i da je γ -glutamil transferaza – enzim koji razgrađuje glutation, lokalizovan samo na apikalnoj površini epitelnih ćelija izvodnih kanala velikih i malih pljuvačnih žlezda (Hanigan i Frierson, 1996). Činjenica da je koncentracija glutaciona znatno manja od one u plazmi direktno ukazuje na visoku aktivnost γ -glutamil transferaze u pljuvačnim žlezdama, ali ne i na poreklo glutaciona koje može biti, kako iz plazme, tako i iz pljuvačnih žlezda.

S druge strane, važno je analizirati i doprinos glutaciona iz gingivalne tečnosti na njegov nivo u pljuvački. Iako je mali doprinos gingivalne tečnosti količini pljuvačke njen doprinos može biti značajan za kvalitativan sastav pljuvačke – pogotovu za one elemente kojih je malo u pljuvački. Interesantan je podatak da u fiziološkim uslovima gingivalna cervikalna tečnost predstavlja samo transudat (ultrafiltrat plazme), i sadrži glutation u koncentracijama ($0,5\text{-}2,5\text{mM}$) značajno većim nego što su u plazmi (oko $3\mu\text{M}$) (Chapple i sar, 2002; Jones i sar, 2000). Ovo je verovatno stoga što neutrofili i/ili epitelne ćelije gingivalnog sulkusa sintetišu glutation (Chapple i sar, 2002). Naši rezultati pokazuju da postoji negativna korelacija između priliva glutaciona i protoka

pljuvačke u populaciji zdravih osoba. To znači da sa većim protokom pljuvačke pljuvačka se više razblažuje i na taj način smanjuje koncentraciju glutaciona poreklom iz gingivalne tečnosti. Ovaj naš rezultat pokazuje da na nivo glutaciona u pljuvački utiče i glutacion poreklom iz gingivalne tečnosti.

Malo se zna o uticaju hipertenzije na salivarni glutacion, dok se više zna o uticaju DM. Naime, kod pacijenata sa hipertenzijom u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački nisu zabeležene promene u koncentraciji redukovanog glutaciona u odnosu na zdrave (Al-Rawi i sar, 2008). S druge strane, kod pacijenata sa DM tip 2 sa klinički zdravim parodontijumom, u odnosu na zdrave ispitanike, postoji smanjena koncentracija redukovanog glutaciona u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački što ukazuje da je smanjen nivo glutaciona posledica DM tip 2 (Al-Rawi, 2011). S druge strane, Gümüş i sar (2009) su pokazali da DM tip 2 udružen sa periodontitisom u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački ne menja koncentraciju redukovanog i oksidisanog glutaciona, dok DM tip 1 smanjuje koncentraciju redukovanog i oksidisanog glutaciona u odnosu na kontrole. U stimulisanoj pljuvački pacijenata sa DM tip 2 koji su i na odgovarajućoj farmakoterapiji prisutnih komplikacija dijabetesa (neuropatije, hipertenzija, i druge cerebro i kardiovaskularne komplikacije), Arana i sar (2006) su pokazali da je usled smanjene aktivnosti glutacion reduktaze smanjena koncentracija redukovanog, a povećana oksidisanog glutaciona u odnosu na zdrave ispitanike, dok je ukupni glutacion nepromenjen u odnosu na zdrave ispitanike.

Kliničke studije pokazuju da enalapril povećava koncentraciju redukovanog glutaciona u plazmi hipertenzivnih pacijenata (Donmez i sar, 2002). Pokazano je i da enalapril povećava koncentracije ukupnog glutaciona u bubrezima, jetri i srcu pacova sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom (de Cavanagh i sar, 2001). Rezultati naše studije pokazuju da kod hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2, kako pre, tako i posle primene enalapрила, nema značajne razlike u koncentracijama ukupnog salivarnog glutaciona u odnosu na zdrave. Takođe, podatak da enalapril u minimalnim i maksimalnim koncentracijama u istoj meri utiče na koncentracije ukupnog glutaciona u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 ukazuje na efikasnost enalapрила na nivou pljuvačke i u minimalnim koncentracijama.

U našoj studiji nemamo podatke o ukupnom salivarnom glutacionu kod hipertenzivnih pacijenata sa ili bez DM tip 2 bez terapije, stoga što je u kliničkim

uslovima teško naći dovoljan broj takvih ispitanika. Stoga je teško pretpostaviti da li je razlog nepostojanja razlike u nivou salivarnog ukupnog glutaciona između hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 na terapiji enalaprilom i zdravih učesnika posledica toga što enalapril popravljaja snižen nivo ukupnog glutaciona izazvan DM tip 2 ili DM tip 2 ne izaziva promene na nivou ukupnog salivarnog glutaciona. S druge strane, treba napomenuti i sledeće ograničenje naše studije. Imajući u vidu činjenicu da je redukovani oblik glutaciona aktivan u neutralizaciji kiseoničnih radikala, to njegova kvantifikacija uz kvantifikaciju ukupnog glutaciona ima mnogo veći značaj nego kvantifikacija samo ukupnog glutaciona. S obzirom da smo korišćenom metodom mogli samo da odredimo ukupni glutacion u pljuvački treba naglasiti da njegove nepromenjene vrednosti između observiranih grupa u principu ne moraju da odraze promenjen kvantitativni odnos između redukovano i oksidovanog oblika glutaciona.

Superoksid dizmutaza (SOD) pripada grupi preventivnih enzimskih antioksidanasa koji štite ćelije inhibišući stvaranje slobodnih radikala. U organizmu SOD je prisutna u više izoformi, i to CuZn-SOD (citoplazmatska, SOD1), Mn-SOD (mitohondrijska, SOD2) i EC-SOD (ekstraćelijska, SOD3). Iako se ove izoforme SOD razlikuju po molekularnoj težini sve tri izoforme imaju istu funkciju, a to je konverzija superoksidnog radikala u vodonik peroksid (Halliwell i Gutteridge, 1990; Akalin i sar, 2005).

U različitim tkivima u hipertenziji (krv - eritrociti) i dijabetesu (jetra, bubreg) u kliničkim i studijama na životinjama pokazano je da su aktivnost, ali i koncentracije SOD smanjene (Deoghare i Kantharia, 2013; Kędziora-Kornatowska i sar, 2006; Kędziora-Kornatowska i sar, 2000; de Cavanagh i sar, 2001). Smatra se da to može biti posledica smanjene ekspresije gena ovog enzima ili njegove inaktivacije slobodnim radikalima (Deoghare i Kantharia, 2013). Međutim, postoje studije koje pokazuju i da su u serumu pacijenata sa DM tip 2 koncentracija i aktivnost SOD povećane, najverovatnije kao adaptacioni mehanizam tkiva na povećan oksidativni stres u dijabetesu (Al-Rawi, 2011). Pretpostavka je da su ova neslaganja najverovatnije posledica promene aktivnosti enzima tokom vremena, adaptacije na oksidativni stres, i analize različitih tkiva (Giugliano i sar, 1996).

SOD kao enzimski antioksidans prisutan je i u pljuvački u sve tri izoforme (Battino i sar, 1999). Iako SOD, u odnosu na salivarnu peroksidazu, pokazuje

sekundarnu antioksidativnu ulogu u pljuvački, mi smo merili aktivnost ukupne SOD (sve tri izoforme) u pljuvački hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 imajući u vidu da je njen supstrat (superoksidni anjon) dominantan radikal u hipertenziji i DM tip 2, kao i da mehanizam antioksidativnog dejstva enalapрила uključuje upravo redukciju stvaranja ovog anjona.

U literaturi postoji samo jedna studija o aktivnost salivarne SOD u uslovima hipertenzije, dok više podataka postoji o aktivnosti SOD u uslovima dijabetesa. Kod pacijenata sa hipertenzijom, kao i DM tip 2 pokazano je da je aktivnost salivarne SOD povećana u odnosu na zdrave (Al-Rawi, 2008; Al-Rawi, 2011). Naši rezultati pokazuju da je aktivnost SOD u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački hipertenzivnih pacijenata sa ili bez DM tip 2 pre i posle primene enalapрила nepromenjena u odnosu na zdrave učesnike. Pokazano je da enalapril povećava aktivnost SOD do fizioloških nivoa u eritrocitima pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom (Deoghare i Kantharia, 2013). U studiji na eksperimentalno izazvanom dijabetesu pokazano je da enalapril sprečava dijabetesom izazvano smanjenje aktivnosti SOD u jetri pacova (de Cavanagh i sar, 2001). Smatra se da je mehanizam ovog dejstva enalapрила posledica sniženog nivoa Ang II i sledstvene smanjene produkcije superoksidnog anjona pod dejstvom NADPH oksidaze (Hosomi i sar, 2001; Deoghare i Kantharia, 2013). Imajući sve ovo u vidu može se pretpostaviti da enalapril sličnim mehanizmom održava aktivnost SOD u pljuvački kod hipertenzivnih pacijenata sa ili bez DM tip 2 na nivou zdravih učesnika.

Interesantan je nalaz da je aktivnost SOD u pljuvački značajno manja kod hipertenzivnih pacijanata bez DM tip 2 posle primene enalapрила nego pre njegove primene. Sličan trend se zapaža kod hipertenzivnih pacijenata sa DM tip 2 ali nije statistički značajan. Ova razlika u delovanju enalapрила u momentu njegovih maksimalnih i minimalnih koncentracija na aktivnost SOD se vidi najverovatnije stoga što je supstrat za SOD samo superoksidni anjon. Naime, s obzirom da enzimska aktivnost zavisi od količine supstrata (u ovom slučaju jednog supstrata) razumljivo je da je u prisustvu maksimalnih koncentracija enalapрила količina superoksidnih anjona manja nego u prisustvu minimalnih koncentracija. Sledstveno tome aktivnost SOD je manja u prisustvu maksimalnih koncentracija enalapрила. Ova razlika u delovanju enalapрила pri minimalnim i maksimalnim koncentracijama se ne vidi kod njegovih drugih antioksidativnih efekata u pljuvački koji uključuju smanjenje MDA, kao i

povećanje totalnog antioksidativnog kapaciteta i ukupnog glutaciona jer koncentracije ovih elemenata ne zavise samo od jednog slobodnog kiseoničnog radikala, već i od drugih, kako kiseoničnih, tako i nitritnih slobodnih radikala.

Pored navedenih antioksidativnih efekata enalapрила na nivou ukupne nestimulisane pljuvačke treba imati u vidu i činjenicu da su hipertenzivni pacijenti sa DM tip 2 primali i oralni antidiijabetik metformin za koji je takođe pokazano da ima antioksidativni efekat (Khoury i sar, 2004; Esteghamati i sar, 2013). S obzirom na činjenicu da se antioksidativni efekat enalapрила na nivou pljuvačke ne razlikuje između pacijenata sa hipertenzijom i pacijenata gde je hipertenzija udružena sa DM tip 2 može se pretpostaviti da metformin sinergistički dopunjuje antioksidativni efekat enalapрила kod hipertenzivnih pacijenata sa DM tip 2.

Glavni izvor NO u kardiovaskularnom sistemu je eNOS (Dudzinski i sar, 2006). eNOS je prisutan ne samo u endotelnim ćelijama krvnih sudova, već i u kardiomiocitima i trombocitima gde učestvuje u očuvanju kardiovaskularne homeostaze (Dudzinski i sar, 2006). Prisustvo eNOS je pokazano i u mast ćelijama, bubrežnom epitelu, eritrocitima i leukocitima (Lowenstein i Michel, 2006; Kleinbongard i sar, 2006; de Frutos i sar, 2001). Soinila i sar (2006) su pokazali da se eNOS nalazi i u pljuvačnim žlezdama čoveka, i to u endotelu žlezdanih krvnih sudova i epitelnim ćelijama izvodnih kanala. Naši rezultati pokazuju da je eNOS prisutna u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački zdravih osoba u koncentraciji $1,63 \pm 0,72$ ng/ml. S obzirom da je eNOS membranski vezan enzim postavlja se pitanje o njegovom poreklu u pljuvački. Naime, Horn i sar (2012) su pokazali da je eNOS prisutan i u plazmi u okviru cirkulatornih mikropartikula (odvojeni delovi ćelijske membrane veličine manje od mikrometra) koje potiču od endotelnih i ćelija krvi za koje je poznato da eksprimiraju eNOS. Imajući ovo u vidu, kao i mehanizam nastanka pljuvačke, može se pretpostaviti da je eNOS prisutan u pljuvački bar delom oslobođen od epitelnih ćelija izvodnih kanala pljuvačnih žlezda i/ili endotelnih ćelija žlezdanih krvnih sudova. S druge strane, moguće je da eNOS u pljuvački može da bude poreklom i iz gingivalne tečnosti. Međutim, za sada je to teško reći s obzirom da u literaturi nema podataka o tome. Postoji podatak da je eNOS prisutan u gingivi čoveka i to u fibroblastima, a ne i u epitelnim ćelijama (Gürkan i sar, 2009), tako da je malo verovatno da ovaj eNOS dopirnosi salivarnom eNOS.

Imajući u vidu činjenicu da je disfunkcija endotela u osnovi, kako hipertenzije, tako i DM tip 2, od značaja je bilo ispitati u kojoj meri se to odražava na koncentraciju eNOS u pljuvački ovakvih pacijenata. Naši rezultati pokazuju da je koncentracija eNOS u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački hipertenzivnih pacijenata bez DM tip 2 pre i posle primene enalapрила slična kao kod zdravih osoba. Imajući u vidu podatak da su u eksperimentalno izazvanoj hipertenziji aktivnost i ekspresija eNOS značajno smanjeni u aorti i srcu pacova (Chou i sar, 1998; Hara i sar, 2001) moglo se očekivati da će koncentracije eNOS u pljuvački hipertenzivnih pacijenata biti manje nego kod zdravih. S druge strane, imajući u vidu činjenicu da ACE inhibitori povećavaju ekspresiju eNOS u srcu hipertenzivnih pacova (Hara i sar, 2001), može se pretpostaviti da je koncentracija eNOS u pljuvački zdravih i hipertenzivnih pacijenata na terapiji enalaprilom slična zbog stimulatornog dejstva enalapрила na ekspresiju ovog enzima.

Za sada postoje podaci da DM u nekim tkivima (srce, aorta, gornja mezenterična arterija) smanjuje ekspresiju eNOS, a u drugim (cerebralni krvni sudovi) povećava koncentraciju eNOS (Nagareddy i sar, 2005; Trauernicht i sar, 2003). Naši rezultati pokazuju da je kod hipertenzivnih pacijenata sa DM tip 2 koncentracija eNOS u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački pre primene enalapрила slična kao kod zdravih osoba, dok su posle primene enalapрила zapažene značajno veće koncentracije eNOS kod hipertenzivnih pacijenata sa DM tip 2 u odnosu na zdrave. Imajući ovo u vidu može se pretpostaviti da enalapril, a ne DM, povećava ekspresiju eNOS u pljuvački ove grupe pacijenata.

Činjenica da je koncentracija eNOS povećana u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački hipertenzivnih pacijenata sa DM tip 2 nakon primene enalapрила, ali da je istovremeno u tim uslovima smanjen protok ukupne nestimulisane pljuvačke, pokazuje da je povećani eNOS u stvari disfunkcionalan jer ne pravi dovoljno NO koji će kao vazodilatator da doprinese izostanku kserogenog efekta kod ove grupe pacijenata. Pokazano je da je u DM disfunkcija eNOS rezultat povećane aktivacije NADPH oksidaze, produkcije superoksida i sledstvene oksidacije glavnog kofaktora NOS tetrahidrobiopterona i/ili smanjene koncentracije dihidrofolat reduktaze (enzim odgovoran za redukciju tetrahidrobiopterona iz oksidovane forme) i sledstvenog utroška tetrahidrobiopterona u aorti miševa sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom, kao i povećane S-glutationilacije eNOS u aorti pacova sa eksperimentalno izazvanim

dijabetesom (Oak i Cai, 2007; Schuhmacher i sar, 2011). S druge strane, Oak i Cai (2007) su pokazali da kaptopril smanjuje aktivnost NADPH oksidaze i povećava ekspresiju dihidrofolat reduktaze u aorti miševa sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom, dok su Galougahi i sar (2014) pokazali smanjenu koncentraciju glutationilisanog eNOS nakon primene kaptoprila u kulturi humanih endotelnih ćelija, aorti zečeva i humanim arterijama *in vitro*. Kako je poznato da disfunkcija eNOS u DM makar delom zavisi od Ang II (Oak i Cai, 2007), a čiju sintezu smanjuju ACE inhibitori, to što je u našoj studiji kod hipertenzivnih pacijenata sa DM tip 2 na terapiji enalaprilom prisutan kserogeni efekat ukazuje da enalapril ipak nije u mogućnosti da u potpunosti vrati funkciju eNOS što bi sledstvenom produkcijom NO doprinelo izostanku kserogenog efekta kod ove grupe pacijenata.

Poznato je da jednu od ključnih uloga u razvoju komplikacija u hipertenziji i dijabetesu ima iNOS, solubilna izoforma NOS enzima. Naime, endotelna disfunkcija prisutna u ovim oboljenjima, makar delom, nastaje kao rezultat povećanog nivoa superoksida koji stimuliše prekomernu sintezu NO aktivacijom iNOS i sledstveno peroksinitrit, visoko reaktivni citotoksični slobodni radikal (Chou i sar, 1998; Nagareddy i sar, 2009; Pacher i sar 2005). Imajući ovo u vidu u našoj studiji ispitivali smo prisustvo i koncentraciju iNOS u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 na terapiji enalaprilom, kao i kod zdravih osoba.

Naši rezultati pokazuju da je koncentracija iNOS u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački zdravih osoba $1,12 \pm 0,76$ ng/ml, vrlo slična pomenutoj koncentraciji eNOS. Kako je poznato da se iNOS eksprimira isključivo u zapaljenskim stanjima i bolestima mogući razlog za pojavu iNOS u pljuvački naših ispitanika je prisustvo periodontalnih oboljenja (gingivitis, periodontitis). Ovo stoga što ovaj enzim u pljuvački, osim iz pljuvačnih žlezda, može poticati i iz gingive. Pokazano je da se ekspresija iNOS u gingivi povećava u prisustvu periodontalnih oboljenja (Lappin i sar, 2000; Pan i sar, 2010). Takođe je pokazano da je u gingivi pacijenata sa gingivitisom i periodontitisom zabeležen povećan broj iNOS pozitivnih ćelija u odnosu na gingivu kontrolne grupe (Batista i sar, 2002). Periodontitis je inače veoma često oboljenje čija prevalenca kod odraslih u većini populacija iznosi 10-15% za teške oblike ovog oboljenja, a 40-60% za umereni oblik periodontitisa (Fox, 1992; Fox i sar, 1994). Takođe, epidemiološki podaci Svetske zdravstvene organizacije pokazuju da se prevalenca i ozbiljnost periodontalnih

oboljenja povećava sa starenjem (Petersen, 2003). Imajući sve ovo u vidu, kao i činjenicu da je prosečna starost zdravih ispitanika u našoj studiji $57,47 \pm 5,75$ godina može se pretpostaviti da je razlog za pojavu iNOS u pljuvački naših ispitanika posledica prisustva periodontalnih oboljenja.

Rezultati naše studije pokazuju da kod hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 pre i posle primene enalaprilu nema statistički značajne razlike u koncentraciji iNOS u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački u odnosu na zdrave. Poznato je da hipertenzija povećava aktivnost i ekspresiju iNOS u tkivu aorte spontano hipertenzivnih pacova (Ghou i sar, 1998; Hong i sar, 2000). U dijabetesu, povećana ekspresija iNOS zabeležena je u krvnim sudovima (aorta i gornja mezenterična arterija) i srcu eksperimentalnih životinja sa dijabetesom u odnosu na životinje bez dijabetesa (Nagareddy i sar, 2005). U odnosu na pljuvačne žlezde povećana ekspresija iNOS u dijabetesu zapažena je u submandibularnoj pljuvačnoj žlezdi pacova, a kod kunića u izolovanim prstenovima parotidne arterije koja ishranjuje parotidnu žlezdu i tkivu parotidne žlezde (Turner i sar, 2011; Roganović i sar, 2011; Roganović i sar, 2015). Takođe je pokazano da dijabetes dodatno povećava ekspresiju iNOS u gingivi pacijenata sa DM tip 2 i hroničnim periodontitisom u odnosu na pacijente samo sa hroničnim periodontitisom (Pan i sar, 2010; Shaker i sar, 2013). Što se tiče efekata ACE inhibitora na ekspresiju iNOS, za sada postoje samo podaci da ovi lekovi smanjuju ekspresiju iNOS u srcu i aorti hipertenzivnih pacova (Ghou i sar, 1998; Pechanova, 2007; Kobayashi i sar, 1999). Imajući sve ovo u vidu može se pretpostaviti da je enalapril kod naših hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 efikasno smanjio povećanu ekspresiju iNOS izazvanu hipertenzijom i DM, ali ne i onu izazvanu periodontitisom. Činjenica da je efekat enalaprilu u minimalnim i maksimalnim koncentracijama na koncentracije iNOS isti u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 ukazuje da enalapril i u minimalnim koncentracijama podjednako efikasno, kao i u maksimalnim, snižava hipertenzijom i/ili DM izazvano povećanje koncentracija iNOS.

ZAKLJUČCI

1. Učestalost kserostomije kod hipertenzivnih pacijenata na terapiji enalaprilom, ACE inhibitorom, i kod zdravih učesnika se ne razlikuje značajno, dok je značajno veća učestalost kserostomije zabeležena kod hipertenzivnih pacijenata sa DM tip 2 u odnosu na zdrave.
2. Binarna logistička regresiona analiza pokazuje da je DM tip 2 faktor rizika za pojavu kserostomije u populaciji hipertenzivnih pacijenata na terapiji enalaprilom.
3. Protok ukupne nestimulisane pljuvačke kod hipertenzivnih pacijenata na terapiji enalaprilom i kod zdravih učesnika se ne razlikuje značajno, dok je značajno manji protok ukupne nestimulisane pljuvačke zabeležen kod hipertenzivnih pacijenata sa DM tip 2 u odnosu na zdrave.
4. Binarna logistička regresiona analiza pokazuje da su DM tip 2 i pol (ženski) faktori rizika za pojavu smanjenog protoka ukupne nestimulisane pljuvačke u populaciji hipertenzivnih pacijenata na terapiji enalaprilom.
5. U tkivu i krvnim sudovima parotidne pljuvačne žlezde i ukupnoj nestimulisanoj pljuvački zdravih osoba prisutne su komponente angiotenzinskog sistema.
6. U svim ispitivanim tkivima koncentracije ACE, enzima koji konvertuje Ang I u Ang II, je slična.
7. ACE2, enzim koji konvertuje Ang II u Ang (1-7), prisutan je u značajno većim koncentracijama u tkivu i krvnim sudovima parotidne žlezde u odnosu na ukupnu nestimulisanu pljuvačku zdravih osoba.
8. U tkivu parotidne žlezde zdravih osoba ACE2 je prisutan u značajno višim koncentracijama od ACE. U krvnim sudovima parotidne pljuvačne žlezde zdravih osoba ACE i ACE2 su prisutni u sličnim koncentracijama. U ukupnoj nestimulisanoj pljuvački zdravih osoba prisutne su značajno veće koncentracije ACE u odnosu na ACE2.
9. AT₁ receptori, receptori za Ang II, nalaze se u većim koncentracijama u krvnim sudovima u odnosu na tkivo parotidne žlezde zdravih osoba.
10. U prisustvu enalaprila, u minimalnim (1 sat pre primene) i maksimalnim (4 sata posle primene) koncentracijama u krvi, koncentracije ACE u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 se značajno ne razlikuju od onih kod zdravih učesnika.

11. U prisustvu minimalnih i maksimalnih koncentracija enalapрила koncentracije ACE u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački se značajno međusobno ne razlikuju kod pacijenata sa hipertenzijom i onih sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2.
12. U prisustvu minimalnih i maksimalnih koncentracija enalapрила koncentracije ACE2 u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački hipertenzivnih pacijenata značajno su veće od onih kod zdravih ispitanika.
13. Kod hipertenzivnih pacijenata sa DM tip 2 u prisustvu minimalnih koncentracija enalapрила koncentracije ACE2 u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački su značajno veće od onih kod zdravih, dok se u prisustvu maksimalnih koncentracija enalapрила značajno ne razlikuju od onih kod zdravih učesnika.
14. U prisustvu minimalnih i maksimalnih koncentracija enalapрила koncentracije ACE2 u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački se značajno međusobno ne razlikuju kod pacijenata sa hipertenzijom i onih sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2.
15. U prisustvu minimalnih koncentracija enalapрила koncentracije MDA vezanog za proteine, markera oksidativnog stresa – lipidna peroksidacija, u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 se značajno ne razlikuju od onih kod zdravih učesnika.
16. U prisustvu maksimalnih koncentracija enalapрила koncentracije MDA vezanog za proteine u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački kod hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 su značajno niže od onih kod zdravih učesnika.
17. U prisustvu minimalnih i maksimalnih koncentracija enalapрила totalni antioksidativni kapacitet, indikator sveukupne antioksidativne zaštite, u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 se značajno ne razlikuje od onih kod zdravih učesnika.
18. U prisustvu minimalnih i maksimalnih koncentracija enalapрила koncentracije totalnog antioksidativnog kapaciteta u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački se značajno međusobno ne razlikuju kod pacijenata sa hipertenzijom i onih sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2.

19. U prisustvu minimalnih i maksimalnih koncentracija enalaprilne koncentracija ukupnog glutaciona, neenzimske komponente antioksidativne zaštite, u ukupnoj nestimuliranoj pljuvački hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 se značajno ne razlikuje od onih kod zdravih učesnika.
20. U prisustvu minimalnih i maksimalnih koncentracija enalaprilne koncentracije ukupnog glutaciona u ukupnoj nestimuliranoj pljuvački se značajno međusobno ne razlikuju kod pacijenata sa hipertenzijom i onih sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2.
21. Aktivnost SOD, enzimske komponente antioksidativne zaštite, u prisustvu minimalnih i maksimalnih koncentracija enalaprilne u ukupnoj nestimuliranoj pljuvački se značajno ne razlikuje kod hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 od one kod zdravih učesnika.
22. U prisustvu maksimalnih koncentracija enalaprilne aktivnost SOD u ukupnoj nestimuliranoj pljuvački je značajno manja od one u prisustvu minimalnih koncentracija enalaprilne kod pacijenata sa hipertenzijom.
23. U prisustvu minimalnih i maksimalnih koncentracija enalaprilne aktivnost SOD u ukupnoj nestimuliranoj pljuvački se značajno međusobno ne razlikuju kod pacijenata sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2
24. Priliv ukupnih antioksidanasa u ukupnu nestimuliranu pljuvačku hipertenzivnih pacijenata u prisustvu minimalnih i maksimalnih koncentracija enalaprilne se značajno ne razlikuje od onih kod zdravih učesnika.
25. Kod hipertenzivnih pacijenata sa DM tip 2 u prisustvu minimalnih i maksimalnih koncentracija enalaprilne priliv ukupnih antioksidanasa u ukupnu nestimuliranu pljuvačku je značajno manji nego kod zdravih učesnika.
26. Enalapril ima pozitivan efekat na priliv antioksidanasa kod hipertenzivnih pacijenata, dok kod hipertenzivnih pacijenata sa DM tip 2 izostaje ovaj efekat zbog smanjenja protoka pljuvačke (značajna pozitivna korelacija između priliva ukupnih antioksidanasa i protoka ukupne nestimulirane pljuvačke u celoj i populaciji pacijenata na terapiji enalaprilom).

27. Priliv ukupnog glutationa u ukupnu nestimulisanu pljuvačku hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 u prisustvu minimalnih i maksimalnih koncentracija enalaprila se ne razlikuje značajno u odnosu na zdrave osobe.
28. Značajna negativna korelacija između priliva ukupnog glutationa i protoka ukupne nestimulisanе pljuvačke u populaciji zdravih osoba ukazuje da na nivo glutationa u pljuvački utiče i glutation poreklom iz gingivalne tečnosti.
29. U prisustvu minimalnih i maksimalnih koncentracija enalaprila koncentracije eNOS, konstitutivne izoforme enzima koji stvara NO, u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački hipertenzivnih pacijenata se značajno ne razlikuju od onih kod zdravih učesnika.
30. Koncentracije eNOS u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački hipertenzivnih pacijenata sa DM tip 2 u prisustvu minimalnih koncentracija enalaprila se ne razlikuju od onih kod zdravih učesnika, dok su u prisustvu maksimalnih koncentracija enalaprila značajno veće od onih kod zdravih učesnika.
31. U prisustvu minimalnih i maksimalnih koncentracija enalaprila koncentracije iNOS, inducibilne izoforme enzima koji stvara NO, u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački hipertenzivnih pacijenata sa i bez DM tip 2 se značajno ne razlikuju od onih kod zdravih učesnika.
32. U prisustvu minimalnih i maksimalnih koncentracija enalaprila koncentracije iNOS u ukupnoj nestimulisanoj pljuvački se značajno međusobno ne razlikuju kod pacijenata sa hipertenzijom i onih sa hipertenzijom udruženom sa DM tip 2.

L I T E R A T U R A

- Ackermann A, Fernández-Alfonso MS, Sanchez de Rojas R, Ortega T, Paul M, Gonzalez C. Modulation of angiotensin-converting enzyme by nitric oxide. *British journal of pharmacology*. 1998;124(2):291-8.
- Adegor EC. Levels of blood total antioxidants among hypertensives in Abraka, Delta State, Nigeria. *Oriental Journal of Chemistry*. 2010;26(3):857.
- Agha-Hosseini F, Mirzaii-Dizgah I, Mansourian A, Khayamzadeh M. Relationship of stimulated saliva 17beta-estradiol and oral dryness feeling in menopause. *Maturitas*. 2009;62(2):197-9.
- Agha-Hosseini F, Mirzaii-Dizgah I, Mikaili S, Abdollahi M. Increased salivary lipid peroxidation in human subjects with oral lichen planus. *International journal of dental hygiene*. 2009;7(4):246-50.
- Ahmadi-Motamayel F, Goodarzi MT, Hendi SS, Kasraei S, Moghimbeigi A. Total antioxidant capacity of saliva and dental caries. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18(4):e553-6
- Akalin FA, Baltacıoğlu E, Alver A, Karabulut E. Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2007;34(7):558-65.
- Akalin FA, Toklu E, Renda N. Analysis of superoxide dismutase activity levels in gingiva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis and periodontally healthy controls. *J Clin Periodontol*. 2005;32(3):238-43.
- Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life sciences*. 2004;75(6):639-53.
- Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci*. 2004;75(6):639-53.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 2001;357(3):593-615.
- Al-Rawi NH, Jaber FA, Atiyah KM. Assessment of salivary and serum oxidative stress and antioxidants as plausible parameters in prediction of ischemic stroke among Iraqi samples. *Internet Journal of Third World Medicine* 2008;7(2):1-15.
- Al-Rawi NH. Oxidative stress, antioxidant status and lipid profile in the saliva of type 2 diabetics. *Diabetes and Vascular Disease Research*. 2011;8(1):22-8.

- Aps JK, Martens LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int.* 2005; 150(2-3):119-31.
- Arafat T, Awad R, Hamad M, Azzam R, Al-Nasan A, Jehanli A, Matalka K. Pharmacokinetics and pharmacodynamics profiles of enalapril maleate in healthy volunteers following determination of enalapril and enalaprilat by two specific enzyme immunoassays. *J Clin Pharm Ther.* 2005;30(4):319-28.
- Arana C, Cutando A, Ferrera MJ, Gómez-Moreno G, Worf CV, Bolaños MJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Parameters of oxidative stress in saliva from diabetic and parenteral drug addict patients. *J Oral Pathol Med.* 2006;35(9):554-9.
- Artico G, Freitas RS, Santos Filho AM, Benard G, Romiti R, Migliari DA. Prevalence of *Candida* spp., xerostomia, and hyposalivation in oral lichen planus--a controlled study. *Oral Dis.* 2014;20(3):e36-41.
- Aslan M, Sabuncu T, Kocyigit A, Celik H, Selek S. Relationship between total oxidant status and severity of diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007;17(10):734-40.
- Astaneie F, Afshari M, Mojtahedi A, Mostafalou S, Zamani MJ, Larijani B, Abdollahi M. Total antioxidant capacity and levels of epidermal growth factor and nitric oxide in blood and saliva of insulin-dependent diabetic patients. *Arch Med Res.* 2005;36(4):376-81.
- Atkinson JC, Grisius M, Massey W. Salivary hypofunction and xerostomia: diagnosis and treatment. *Dent Clin North Am.* 2005; 49(2):309-26.
- Atkinson JC, Grisius M, Massey W. Salivary hypofunction and xerostomia: diagnosis and treatment. *Dent Clin North Am.* 2005;49(2):309-26.
- Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *Journal of managed care pharmacy.* 2007;13(8 Supp B):9-20.
- Bachetti T, Comini L, Pasini E, Cargnoni A, Curello S, Ferrari R. Ace-inhibition with quinapril modulates the nitric oxide pathway in normotensive rats. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33(3):395-403.
- Bader M. ACE2, angiotensin-(1-7), and Mas: the other side of the coin. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology.* 2013;465(1):79-85.

- Bakris G. Are there effects of renin-angiotensin system antagonists beyond blood pressure control? *Am J Cardiol.* 2010;105(1 Suppl):21A-9A.
- Barbagallo M, Resnick LM, Dominguez LJ, Licata G. Diabetes mellitus, hypertension and ageing: the ionic hypothesis of ageing and cardiovascular-metabolic diseases. *Diabetes Metab.* 1997;23(4):281-94.
- Batista AC, Silva TA, Chun JH, Lara VS. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. *Oral Dis.* 2002;8(5):254-60.
- Battino M, Bullon P, Wilson M, Newman H. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999;10(4):458-76.
- Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol.* 2002;29(3):189-94.
- Baum BJ, Dai Y, Hiramatsu Y, Horn VJ, Ambudkar IS. Signaling mechanisms that regulate saliva formation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4(3-4):379-84.
- Baum BJ. Neurotransmitter control of secretion. *J Dent Res.* 1987; 66:628-32.
- Baum BJ. Principles of saliva secretion. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 694:17-23.
- Baum BJ, Wellner RB. Receptors in salivary glands. In: Garrett JR, Ekstrom J, Anderson LC editor. *Neural Mechanisms of Salivary Secretion.*:Basel: Karger; 1999; vol. 3, pp. 44–58
- Beldent V, Michaud A, Bonnefoy C, Chauvet MT, Corvol P. Cell surface localization of proteolysis of human endothelial angiotensin I-converting enzyme. Effect of the amino-terminal domain in the solubilization process. *J Biol Chem.* 1995;270(48):28962-9.
- Belova LA. Angiotensin II-generating enzymes. *Biochemistry (Moscow).* 2000;65(12):1337-45.
- Ben-Aryeh H, Miron D, Szargel R, Gutman D. Whole-saliva secretion rates in old and young healthy subjects. *J Dent Res.* 1984;63(9):1147-8.
- Benzing T, Fleming I, Blaukat A, Müller-Esterl W, Busse R. Angiotensin-converting enzyme inhibitor ramiprilat interferes with the sequestration of the B2 kinin receptor within the plasma membrane of native endothelial cells. *Circulation.* 1999;99(15):2034-40.

- Bergdahl M, Bergdahl J. Low unstimulated salivary flow and subjective oral dryness: association with medication, anxiety, depression, and stress. *J Dent Res*. 2000;79(9):1652-8.
- Bian B, Kelton CM, Guo JJ, Wigle PR. ACE Inhibitor and ARB utilization and expenditures in the Medicaid fee-for-service program from 1991 to 2008. *J Manag Care Pharm*. 2010;16(9):671-9.
- Bing J, Poulsen K. Differences in renal and submaxillary renin release after stimulation with isoprenaline and noradrenaline. *Acta physiologica Scandinavica*. 1979;105(1):58-63.
- Bing JE, Poulsen KN, Hackenthal EB, Rix EC, Taugner RO. Renin in the submaxillary gland: a review. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1980;28(8):874-80.
- Boaz M, Matas Z, Biro A, Katzir ZE, Green M, Fainaru M, Smetana S. Serum malondialdehyde and prevalent cardiovascular disease in hemodialysis. *Kidney international*. 1999;56(3):1078-83.
- Borisenkov MF, Erunova LA, Lyuseva EM, Pozdeeva NV. Diurnal changes in the total antioxidant activity of human saliva. *Human Physiology*. 2007;33(3):375-6.
- Boulanger C, Lüscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *Journal of Clinical Investigation*. 1990;85(2):587.
- Bravi MC, Armiento A, Laurenti O, Cassone-Faldetta M, De Luca O, Moretti A, De Mattia G. Insulin decreases intracellular oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2006;55(5):691-5.
- Brown CM, Snowdon CF, Slee B, Sandle LN, Rees WD. Effect of topical oesophageal acidification on human salivary and oesophageal alkali secretion. *Gut*. 1995;36(5):649-53.
- Brown NJ, Vaughan DE. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation*. 1998;97(14):1411-20.
- Calixto JB, Medeiros YS. Effect of protein kinase C and calcium on bradykinin-mediated contractions of rabbit vessels. *Hypertension*. 1992;19(2 Suppl):II87-II93

- Campbell DJ, Kladis A, Duncan AM. Nephrectomy, converting enzyme inhibition, and angiotensin peptides. *Hypertension*. 1993;22(4):513-22.
- Carbonneau MA, Peuchant E, Sess D, Canioni P, Clerc M. Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. *Clin Chem*. 1991;37(8):1423-9.
- 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(4):E309-14.
- Celecová V, Kamodyová N, Tóthová Ľ, Kúdela M, Celec P. Salivary markers of oxidative stress are related to age and oral health in adult non-smokers. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2013;42(3):263-6.
- Chan E, Chan JY, Wu JH, Wan CW, Leung GP, Lee SM, Kwan YW, Chan SW. Serum nitric oxide synthase activity is a novel predictor of impaired vasorelaxation in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012;39(10):894-6.
- Chandran G, Sirajudeen KN, Yusoff NS, Swamy M, Samarendra MS. Effect of the antihypertensive drug enalapril on oxidative stress markers and antioxidant enzymes in kidney of spontaneously hypertensive rat. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:608512.
- Chapple IL, Mason GI, Garner I, Matthews JB, Thorpe GH, Maxwell SR, Whitehead TP. Enhanced chemiluminescent assay for measuring the total antioxidant capacity of serum, saliva and crevicular fluid. *Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry in medicine*. 1997;34(4):412-21.
- Chapple IL, Brock G, Eftimiadi C, Matthews JB. Glutathione in gingival crevicular fluid and its relation to local antioxidant capacity in periodontal health and disease. *Mol Pathol*. 2002;55(6):367-73.
- Chatterjee K, Rouleau JL, Parmley WW. Haemodynamic and myocardial metabolic effects of captopril in chronic heart failure. *Br Heart J*. 1982; 47(3):233-8.
- Chaturvedi N, Sjolie AK, Stephenson JM, Abrahamian H, Keipes M, Castellarin A, Rogulja-Pepeonik Z, Fuller JH. Effect of lisinopril on progression of retinopathy in normotensive people with type 1 diabetes. The EUCLID Study Group. EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Lancet*. 1998;351(9095):28-31.

- Chavez EM, Taylor GW, Borrell LN, Ship JA. Salivary function and glycemic control in older persons with diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000;89(3):305-11.
- Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension.* 1998;31(2):643-8.
- Coates D. The angiotensin converting enzyme (ACE). *The international journal of biochemistry & cell biology.* 2003;35(6):769-73.
- Contreras F, Rivera M, Vasquez J, De la Parte MA, Velasco M. Diabetes and hypertension physiopathology and therapeutics. *J Hum Hypertens.* 2000;14 Suppl 1:S26-31.
- Cyr M, Lepage Y, Blais C, Gervais N, Cugno M, Rouleau JL, Adam A. Bradykinin and des-Arg9-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 2001;281(1):H275-83.
- Danser AJ. Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 2003;35(6):759-68.
- Das MA, Hartley JL, Soffers RL. Serum angiotensin-converting enzyme. Isolation and relationship to the pulmonary enzyme. *Journal of Biological Chemistry.* 1977;252(4):1316-9.
- Dawes C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *J Am Dent Assoc.* 2008; 139 Suppl:18S-24S.
- de Cavanagh EM, Inserra F, Ferder L, Fraga CG. Enalapril and captopril enhance glutathione-dependent antioxidant defenses in mouse tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278(3):R572-7.
- de Cavanagh EM, Inserra F, Ferder L, Romano L, Ercole L, Fraga CG. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities are increased by enalapril and captopril in mouse liver. *FEBS Lett.* 1995;361(1):22-4.
- de Cavanagh EM, Inserra F, Toblli J, Stella I, Fraga CG, Ferder L. Enalapril attenuates oxidative stress in diabetic rats. *Hypertension.* 2001;38(5):1130-6.

- de Frutos, Sánchez de Miguel L, Farré J, Gómez J, Romero J, Marcos-Alberca P, Nuñez A, Rico L, López-Farré A. Expression of an endothelial-type nitric oxide synthase isoform in human neutrophils: modification by tumor necrosis factor- α and during acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(3):800-7.
- De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger TH. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological reviews*. 2000;52(3):415-72.
- de Gasparo M. Angiotensin II and nitric oxide interaction. *Heart Fail Rev*. 2002;7(4):347-58
- de Matos LF, Pereira SM, Kaminagakura E, Marques LS, Pereira CV, van der Bilt A, i sar. Relationships of beta-blockers and anxiolytics intake and salivary secretion, masticatory performance and taste perception. *Arch Oral Biol* 2010;55: 164-169.
- Del Fiacco M, Quartu M, Ekström J, Melis T, Boi M, Isola M, i sar. Effect of the neuropeptides vasoactive intestinal peptide, peptide histidine methionine and substance P on human major salivary gland secretion. *Oral Dis*. 2015; 21(2):216-23.
- Dendorfer A, Reißmann S, Wolfrum S, Raasch W, Dominiak P. Potentiation of kinin analogues by ramiprilat is exclusively related to their degradation. *Hypertension*. 2001;38(1):142-6.
- Dendorfer A, Wolfrum S, Wellhöner P, Korsman K, Dominiak P. Intravascular and interstitial degradation of bradykinin in isolated perfused rat heart. *British journal of pharmacology*. 1997;122(6):1179-87.
- Deoghare S, Kantharia ND. Effect of atenolol and enalapril treatment on oxidative stress parameters in patients with essential hypertension. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*. 2013;2(3):252-6.
- Diab-Ladki R, Pellat B, Chahine R. Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal diseases. *Clinical oral investigations*. 2003;7(2):103-7.
- Dias-Peixoto MF, Santos RA, Gomes ER, Alves MN, Almeida PW, Greco L, Rosa M, Fauler B, Bader M, Alenina N, Guatimosim S. Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension*. 2008;52(3):542-8.

- Dillioglugil MO, Mekik H, Muezzinoglu B, Ozkan TA, Demir CG, Dillioglugil O. Blood and tissue nitric oxide and malondialdehyde are prognostic indicators of localized prostate cancer. *International urology and nephrology*. 2012;44(6):1691-6.
- Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond)*. 2001;100(5):481-92.
- Djukić LJ, Roganović J, Brajović MD, Bokonjić D, Stojić D. The effects of anti-hypertensives and type 2 diabetes on salivary flow and total antioxidant capacity. *Oral Dis*. 2015;21(5):619-25.
- Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. *J Dent*. 2005;33(3):223-33.
- Donmez G, Dericci U, Erbas D, Arinsoy T, Onk A, Sindel S, Hasanoglu E. The effects of losartan and enalapril therapies on the levels of nitric oxide, malondialdehyde, and glutathione in patients with essential hypertension. *Jpn J Physiol*. 2002;52(5):435-40.
- Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation research*. 2000;87(5):e1-9.
- Duckworth WC. Hyperglycemia and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep*. 2001;3(5):383-91.
- Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006;46:235-76.
- Duka I, Kintsurashvili E, Gavras I, Johns C, Bresnahan M, Gavras H. Vasoactive potential of the B1 bradykinin receptor in normotension and hypertension. *Circulation Research*. 2001;88(3):275-81.
- Duncan AM, Kladis A, Jennings GL, Dart AM, Esler M, Campbell DJ. Kinins in humans. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2000;278(4):R897-904.

- Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, Cohen J, Dahlöf B, Deanfield J, i sar. The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data. *The American journal of cardiology*. 2001;88(9):1-20.
- Edwards AV. Autonomic control of salivary blood flow. In: Garrett JR, Ekström J, Anderson LC, eds. *Glandular Mechanisms of Salivary Secretion (Frontiers of Oral Biology)*, 1st edn. Karger: Basel, 1998, pp. 101-117.
- Ekström J, Ekman R. Sympathectomy-induced increases in calcitonin gene-related peptide (CGRP)-, substance P- and vasoactive intestinal peptide (VIP)-levels in parotid and submandibular glands of the rat. *Arch Oral Biol*. 2005; 50(10):909-17.
- Ekström J, Khosravani N, Castagnola M, Messana I. Saliva and the control of its secretion. In: Ekberg O, ed. *Dysphagia*. Springer Berlin Heidelberg, 2011, pp. 19-47
- Ekström J, Månsson B, Tobin G. Vasoactive intestinal peptide evoked secretion of fluid and protein from rat salivary glands and the development of supersensitivity. *Acta Physiol Scand*. 1983;119(2):169-75.
- Ekström J, Olgart L. Complementary action of substance P and vasoactive intestinal peptide on the rat parotid secretion. *Acta Physiol Scand*. 1986; 126(1):25-31.
- Ekström J, Wahlestedt C. Supersensitivity to substance P and physalaemin in rat salivary glands after denervation or decentralization. *Acta Physiol Scand*. 1982; 115(4):437-46.
- Ekstrom J. Role of nonadrenergic, noncholinergic autonomic transmitters in salivary glandular activities in vivo. In: Garrett JR, Ekstrom J, Anderson LC editor. *Neural Mechanisms of Salivary Secretion*. vol. 6:Basel: Karger; 1999;p. 94–130
- English WR, Corvol P, Murphy G. LPS activates ADAM9 dependent shedding of ACE from endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;421(1):70-5.
- Erdös EG, Tan F, Skidgel RA. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B1 and B2 receptor function. *Hypertension*. 2010;55(2):214-20.

- Esteghamati A, Eskandari D, Mirmiranpour H, Noshad S, Mousavizadeh M, Hedayati M, Nakhjavani M. Effects of metformin on markers of oxidative stress and antioxidant reserve in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *Clin Nutr.* 2013;32(2):179-85.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991;11(1):81-128.
- Esther CR, Marino EM, Howard TE, Machaud A, Corvol P, Capecchi MR, Bernstein KE. The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J Clin Invest.* 1997;99(10):2375-85.
- Fabris B, Jackson B, Kohzuki M, Perich R, Johnston CI. Increased cardiac angiotensin-converting enzyme in rats with chronic heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1990;17(4):309-14.
- Fabris B, Yamada H, Cubela R, Jackson B, Mendelsohn FA, Johnston CI. Characterization of cardiac angiotensin converting enzyme (ACE) and in vivo inhibition following oral quinapril to rats. *Br J Pharmacol.* 1990;100(3):651-5.
- Fagyas M, Úri K, Siket IM, Daragó A, Boczán J, Bányai E, Édes I, Papp Z, Tóth A. New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) I: endogenous angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition. *PLoS One.* 2014;9(4):e87843.
- Fagyas M, Úri K, Siket IM, Daragó A, Boczán J, Bányai E, Édes I, Papp Z, Tóth A. New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) III: endogenous inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) provides protection against cardiovascular diseases. *PLoS One.* 2014;9(4):e93719.
- Faxon DP, Creager MA, Halperin JL, Sussman HA, Gavras H, Ryan TJ. The effect of angiotensin converting enzyme inhibition of coronary blood flow and hemodynamics in patients without coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 1982;2(2):251-62.
- Fazekas A, Olgart L, Gazelius B, Kerezoudis N, Edwall L. Effects of angiotensin II on blood flow in rat submandibular gland. *Acta Physiol Scand.* 1991; 142(4):503-7.

- Félétou M. The Endothelium, Part I: Multiple Functions of the Endothelial Cells--Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. In Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function 2011 (Vol. 3, No. 4, pp. 1-306). Morgan & Claypool Life Sciences.
- Ferrario CM, Varagic J. The ANG-(1-7)/ACE2/mas axis in the regulation of nephron function. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2010;298(6):F1297-305.
- Ferrario CM, Jessup J, Gallagher PE, Averill DB, Brosnihan KB, Ann Tallant E, Smith RD, Chappell MC. Effects of renin-angiotensin system blockade on renal angiotensin-(1-7) forming enzymes and receptors. *Kidney Int*. 2005;68(5):2189-96.
- Ferrario CM, Varagic J. The ANG-(1-7)/ACE2/mas axis in the regulation of nephron function. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;298(6):F1297-305.
- Fiordaliso F, Cuccovillo I, Bianchi R, Bai A, Doni M, Salio M, De Angelis N, Ghezzi P, Latini R, Masson S. Cardiovascular oxidative stress is reduced by an ACE inhibitor in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Life Sci*. 2006;79(2):121-9.
- Fiordaliso F, Leri A, Cesselli D, Limana F, Safai B, Nadal-Ginard B, Anversa P, Kajstura J. Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death. *Diabetes*. 2001;50(10):2363-75.
- Fox CH, Jette AM, McGuire SM, Feldman HA, Douglass CW. Periodontal disease among New England elders. *J Periodontol*. 1994;65(7):676-84.
- Fox CH. New considerations in the prevalence of periodontal disease. *Curr Opin Dent*. 1992;2:5-11.
- Gainer JV, Morrow JD, Loveland A, King DJ, Brown NJ. Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects. *N Engl J Med*. 1998;339(18):1285-92.
- Galougahi KK, Liu CC, Gentile C, Kok C, Nunez A, Garcia A, Fry NA, Davies MJ, Hawkins CL, Rasmussen HH, Figtree GA. Glutathionylation mediates angiotensin II-induced eNOS uncoupling, amplifying NADPH oxidase-dependent endothelial dysfunction. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(2):e000731.

- Garrett JR, Anderson LC. Rat sublingual salivary glands: secretory changes on parasympathetic or sympathetic nerve stimulation and a reappraisal of the adrenergic innervation of striated ducts. *Arch Oral Biol.* 1991; 36(9):675-83.
- Garrett JR. The innervation of normal human submandibular and parotid salivary glands. Demonstrated by cholinesterase histochemistry, catecholamine fluorescence and electron microscopy. *Arch Oral Biol.* 1967; 12(12):1417-36.
- Garrett JR. The proper role of nerves in salivary secretion: a review. *J Dent Res.* 1987; 66(2):387-97.
- Garrido AM, Griendling KK. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Molecular and cellular endocrinology.* 2009;302(2):148-58.
- Gava E, de Castro CH, Ferreira AJ, Colleta H, Melo MB, Alenina N, Bader M, Oliveira LA, Santos RA, Kitten GT. Angiotensin-(1-7) receptor Mas is an essential modulator of extracellular matrix protein expression in the heart. *Regulatory peptides.* 2012;175(1):30-42.
- Gavras H, Gavras I, Textor S, Volicer L, Brunner HR, Rucinska EJ. Effect of angiotensin converting enzyme inhibition on blood pressure, plasma renin activity and plasma aldosterone in essential hypertension. *J Clin Endocrinol Metab.* 1978;46(2):220-6.
- Gembardt F, Sterner-Kock A, Imboden H, Spalteholz M, Reibitz F, Schultheiss HP, Siems WE, Walther T. Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. *Peptides.* 2005;26(7):1270-7.
- Ghiadoni L, Magagna A, Versari D, Kardasz I, Huang Y, Taddei S, Salvetti A. Different effect of antihypertensive drugs on conduit artery endothelial function. *Hypertension.* 2003;41(6):1281-6.
- Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine.* 2000;29(11):1106-14.
- Gibbins HL, Proctor GB, Yakubov GE, Wilson S, Carpenter GH. Concentration of salivary protective proteins within the bound oral mucosal pellicle. *Oral Dis.* 2014; 20(7):707-13.
- Gislon Da Silva RM. Captopril-induced bilateral parotid and submandibular sialadenitis. *Eur J Clin Pharmacol.* 2004;60(6):449-53.

- Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*. 1996;19(3):257-67.
- Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Baha MJ, et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129(3):e28-e292.
- Gobeil, Jr F, Hallé S, Blais PA, Regoli D. Studies on the angiotensin-converting enzyme and the kinin B2 receptor in the rabbit jugular vein: modulation of contractile response to bradykinin. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2002;80(2):151-61.
- Gohlke P, Pees C, Unger T. AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension*. 1998;31(1):349-55.
- Gomes ER, Lara AA, Almeida PW, Guimarães D, Resende RR, Campagnole-Santos MJ, Bader M, Santos RA, Guatimosim S. Angiotensin-(1-7) Prevents Cardiomyocyte Pathological Remodeling Through a Nitric Oxide/Guanosine 3', 5'-Cyclic Monophosphate-Dependent Pathway. *Hypertension*. 2010;55(1):153-60.
- González S, Sung H, Sepúlveda D, González M, Molina C. Oral manifestations and their treatment in Sjögren's syndrome. *Oral Dis*. 2014;20(2):153-61.
- Gröschl M. The physiological role of hormones in saliva. *Bioessays*. 2009; 31(8):843-52.
- Gu Q, Burt VL, Dillon CF, Yoon S. Trends in antihypertensive medication use and blood pressure control among United States adults with hypertension: the National Health And Nutrition Examination Survey, 2001 to 2010. *Circulation*. 2012;126(17):2105-14.
- Guentsch A, Preshaw PM, Bremer-Streck S, Klinger G, Glockmann E, Sigusch BW. Lipid peroxidation and antioxidant activity in saliva of periodontitis patients: effect of smoking and periodontal treatment. *Clinical oral investigations*. 2008;12(4):345-52.
- Guentsch A, Preshaw PM, Bremer-Streck S, Klinger G, Glockmann E, Sigusch BW. Lipid peroxidation and antioxidant activity in saliva of periodontitis patients: effect of smoking and periodontal treatment. *Clin Oral Investig*. 2008;12(4):345-52.

- Gümüs P, Buduneli N, Cetinkalp S, Hawkins SI, Renaud D, Kinane DF, Scott DA. Salivary antioxidants in patients with type 1 or 2 diabetes and inflammatory periodontal disease: a case-control study. *Journal of periodontology*. 2009;80(9):1440-6.
- Gürkan A, Emingil G, Öktem G, Selvi N, Afacan B, İlgenli T i sar. Immunohistochemical analysis of inducible and endothelial forms of nitric oxide synthase in cyclosporin A-induced gingival overgrowth. *Journal of periodontology*. 2009;80:1638-47.
- Guy JL, Lambert DW, Warner FJ, Hooper NM, Turner AJ. Membrane-associated zinc peptidase families: comparing ACE and ACE2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2005;1751(1):2-8.
- Habbab KM, Moles DR, Porter SR. Potential oral manifestations of cardiovascular drugs. *Oral Dis*. 2010 ;16(8):769-73.
- Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental health perspectives*. 1994;102(Suppl 10):5-12
- Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in medicine and biology*. Clarendon: Oxford. 1999.
- Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993;57:715S-725S
- Halliwell B. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition reviews*. 1997;55(1):44-8.
- Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*. 1990;280(1):1-8.
- Hamosh M, Burns WA. Lipolytic activity of human lingual glands (Ebner). *Lab Invest*. 1977; 37(6):603-8.
- Han P, Suarez-Durall P, Mulligan R. Dry mouth: a critical topic for older adult patients. *J Prosthodont Res*. 2015; 59(1):6-19.
- Hanigan MH, Frierson HF Jr. Immunohistochemical detection of gamma-glutamyl transpeptidase in normal human tissue. *J Histochem Cytochem*. 1996;44(10):1101-8.

- Hannig C, Hannig M, Attin T. Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci.* 2005; 113(1):2-13.
- Hansson L, Lindholm LH, Niskanen L, Lanke J, Hedner T, Niklason A, Luomanmäki K, Dahlöf B, de Faire U, Mörlin C, Karlberg BE, Wester PO, Björck JE. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet.* 1999;353(9153):611-6.
- Hara K, Kobayashi N, Watanabe S, Tsubokou Y, Matsuoka H. Effects of quinapril on expression of eNOS, ACE, and AT1 receptor in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2001;14(4 Pt 1):321-30.
- Harmer D, Gilbert M, Borman R, Clark KL. Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS letters.* 2002;532(1):107-10.
- Hauser-Kronberger C, Albegger K, Saria A, Hacker GW. Neuropeptides in human salivary (submandibular and parotid) glands. *Acta Otolaryngol.* 1992; 112(2):343-8.
- Hayashi K, Saito K, Kizawa Y, Sano M, Kusama T, Iwamoto K, Murakami H. Involvement of angiotensin II and endothelin-1 in the development of submandibular gland hypertrophy in response to isoproterenol in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology.* 2000;126(2):123-8.
- Healy JK, Fraser PA, Young JA. Inhibition of sodium transport by angiotensin II in the main duct of the rabbit mandibular gland isolated and perfused in vitro. *Pflugers Arch.* 1976; 363(1):69-73.
- Heft MW, Baum BJ. Unstimulated and stimulated parotid salivary flow rate in individuals of different ages. *J Dent Res.* 1984;63(10):1182-5.
- Heitsch H, Brovkovich S, Malinski T, Wiemer G. Angiotensin-(1-7)-stimulated nitric oxide and superoxide release from endothelial cells. *Hypertension.* 2001;37(1):72-6.
- Hershkovich O, Shafat I, Nagler RM. Age-related changes in salivary antioxidant profile: possible implications for oral cancer. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences.* 2007;62(4):361-6.

- Higuchi S, Ohtsu H, Suzuki H, Shirai H, Frank GD, Eguchi S. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clinical Science*. 2007;112(8):417-28.
- Hilton SM, Lewis GP. The relationship between glandular activity, bradykinin formation and functional vasodilatation in the submandibular salivary gland. *J Physiol*. 1956; 134(2):471-83.
- Hirayama O, Takagi M, Hukumoto K, Katoh S. Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence. *Anal Biochem*. 1997;247(2):237-41.
- Hockings N, Ajayi AA, Reid JL. Age and the pharmacokinetics of angiotensin converting enzyme inhibitors enalapril and enalaprilat. *Br J Clin Pharmacol*. 1986;21(4):341-8.
- Hong HJ, Loh SH, Yen MH. Suppression of the development of hypertension by the inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol*. 2000;131(3):631-7.
- Hong YL, Yeh SL, Chang CY, Hu ML. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. *Clin Biochem*. 2000;33(8):619-25.
- Horn P, Cortese-Krott MM, Amabile N, Hundsdörfer C, Kröncke KD, Kelm M, Heiss C. Circulating microparticles carry a functional endothelial nitric oxide synthase that is decreased in patients with endothelial dysfunction. *J Am Heart Assoc*. 2012;2(1):e003764.
- Hornig B, Kohler C, Drexler H. Role of bradykinin in mediating vascular effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in humans. *Circulation*. 1997; 95(5):1115-8.
- Hosomi N, Mizushige K, Ohyama H, Takahashi T, Kitadai M, Hatanaka Y, Matsuo H, Kohno M, Koziol JA. Angiotensin-converting enzyme inhibition with enalapril slows progressive intima-media thickening of the common carotid artery in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Stroke*. 2001;32(7):1539-45.
- Hosseini A, Abdollahi M. Diabetic neuropathy and oxidative stress: therapeutic perspectives. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:168039.

- Hwang C, Sinsky AJ, Lodish HF. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*. 1992;257(5076):1496-502.
- Hyvärinen S, Uchida K, Varjosalo M, Jokela R, Jokiranta TS. Recognition of Malondialdehyde-modified Proteins by the C Terminus of Complement Factor H Is Mediated via the Polyanion Binding Site and Impaired by Mutations Found in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(7):4295-306.
- Iannitti T, Rottigni V, Palmieri B. Role of free radicals and antioxidant defences in oral cavity-related pathologies. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 2012; 41(9): 649-661.
- Ichiki T, Usui M, Kato M, Funakoshi Y, Ito K, Egashira K, Takeshita A. Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide. *Hypertension*. 1998;31(1):342-6.
- Ignjatovic T, Stanisavljevic S, Brovkovich V, Skidgel RA, Erdös EG. Kinin B1 receptors stimulate nitric oxide production in endothelial cells: signaling pathways activated by angiotensin I-converting enzyme inhibitors and peptide ligands. *Mol Pharmacol*. 2004;66(5):1310-6.
- Ikebe K, Matsuda K, Morii K, Wada M, Hazeyama T, Nokubi T, Ettinger RL. Impact of dry mouth and hyposalivation on oral health-related quality of life of elderly Japanese. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103(2):216-22.
- Ikegami H, Endoh T, Suzuki T. Angiotensin II-induced inhibition of calcium currents in hamster submandibular ganglion neurons. *Neurosci Res*. 2001; 41(3):227-32.
- Inoue H, Ono K, Masuda W, Morimoto Y, Tanaka T, Yokota M, Inenaga K. Gender difference in unstimulated whole saliva flow rate and salivary gland sizes. *Arch Oral Biol*. 2006;51(12):1055-60.
- Isenman L, Liebow C, Rothman S. The endocrine secretion of mammalian digestive enzymes by exocrine glands. *Am J Physiol*. 1999; 276:E223-32.
- Ishigai Y, Mori T, Ikeda T, Fukuzawa A, Shibano T. Role of bradykinin-NO pathway in prevention of cardiac hypertrophy by ACE inhibitor in rat cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1997;273(6):H2659-63.

- Iusuf D, Henning RH, van Gilst WH, Roks AJ. Angiotensin-(1-7): pharmacological properties and pharmacotherapeutic perspectives. *Eur J Pharmacol.* 2008;585(2-3):303-12.
- Iwai M, Horiuchi M. Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. *Hypertension Research.* 2009;32(7):533-6.
- Iwata M, Cowling RT, Gurantz D, Moore C, Zhang S, Yuan JX, Greenberg BH. Angiotensin-(1-7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 2005;289(6):H2356-63.
- Jain SK, McVie R, Smith T. Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of type 1 diabetic children. *Diabetes Care.* 2000;23(9):1389-94.
- Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 1990;9(6):515-40.
- Jensen SB, Pedersen AM, Vissink A, Andersen E, Brown CG, Davies AN, et al. A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: prevalence, severity and impact on quality of life. *Support Care Cancer.* 2010;18(8):1039-60.
- Johansson AK, Johansson A, Unell L, Ekbäck G, Ordell S, Carlsson GE. Self-reported dry mouth in Swedish population samples aged 50, 65 and 75 years. *Gerodontology.* 2012; 29(2):e107-15.
- Johnston CI, Fabris B, Yamada H, Mendelsohn FA, Cubela R, Sivell D, Jackson B. Comparative studies of tissue inhibition by angiotensin converting enzyme inhibitors. *J Hypertens Suppl.* 1989;7(5):S11-6.
- Johnston CI, Fabris B, Yoshida K. The cardiac renin-angiotensin system in heart failure. *Am Heart J.* 1993;126(3 Pt 2):756-60.
- Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(4):625-35.
- Kaczmarek U. Suchość jamy ustnej-etiologia, częstość występowania i rozpoznanie-na podstawie piśmiennictwa. *Czas Stomatol.* 2007;60:20-31.

- Kakoki M, McGarrah RW, Kim HS, Smithies O. Bradykinin B1 and B2 receptors both have protective roles in renal ischemia/reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(18):7576-81.
- Kandár R. The ratio of oxidized and reduced forms of selected antioxidants as a possible marker of oxidative stress in humans. *Biomed Chromatogr*. 2016;30(1):13-28.
- Kawajiri M, Mogi M, Higaki N, Matsuoka T, Ohyagi Y, Tsukuda K, Kohara K, Horiuchi M, Miki T, Kira JI. Angiotensin-converting enzyme (ACE) and ACE2 levels in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2009;15(2):262-5.
- Kędziora-Kornatowska K, Czuczejko J, Szewczyk-Golec K, Motyl J, Szadujkis-Szadurski L, Kornatowski T, Pawluk H, Kędziora J. Effects of perindopril and hydrochlorothiazide on selected indices of oxidative stress in the blood of elderly patients with essential hypertension. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 2006;33(8):751-6.
- Kędziora-Kornatowska KZ, Luciak M, Paszkowski J. Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the diabetic kidney: effect of treatment with angiotensin convertase inhibitors. *IUBMB Life*. 2000;49(4):303-7.
- Kesarwala AH, Krishna MC, Mitchell JB. Oxidative stress in oral diseases. *Oral Dis*. 2016;22(1):9-18.
- Keswani SG, Balaji S, Le LD, Leung A, Parvadia JK, Frischer J, i sar. Role of salivary vascular endothelial growth factor (VEGF) in palatal mucosal wound healing. *Wound Repair Regen*. 2013; 21(4):554-62.
- Khouri H, Collin F, Bonnefont-Rousselot D, Legrand A, Jore D, Gardès-Albert M. Radical-induced oxidation of metformin. *Eur J Biochem*. 2004;271(23-24):4745-52.
- Kinoshita A, Urata H, Bumpus FM, Husain A. Measurement of angiotensin I converting enzyme inhibition in the heart *Circ Res*. 1993;73(1):51-60.
- Klauser RJ, Robinson CJ, Marinkovic DV, Erdős EG. Inhibition of human peptidyl dipeptidase (angiotensin I converting enzyme: kininase II) by human serum albumin and its fragments. *Hypertension*. 1979;1(3):281-6.

- Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Ozüyanan B, Schnürch HG, Gödecke A, Weber AA, Robenek M, Robenek H, Bloch W, Rösen P, Kelm M. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood*. 2006;107(7):2943-51.
- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal*. 1994;298(Pt 2):249.
- Kobayashi N, Higashi T, Hara K, Shirataki H, Matsuoka H. Effects of imidapril on NOS expression and myocardial remodelling in failing heart of Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 1999;44(3):518-26.
- Kokkonen JO, Lindstedt KA, Kuoppala A, Kovanen PT. Kinin-degrading pathways in the human heart. *Trends in cardiovascular medicine*. 2000;10(1):42-5.
- Konoshita T, Wakahara S, Mizuno S, Motomura M, Aoyama C, Makino Y, Kawai Y, Kato N, Koni I, Miyamori I, Mabuchi H. Tissue gene expression of renin-angiotensin system in human type 2 diabetic nephropathy. *Diabetes Care*. 2006;29(4):848-52.
- Kotani K, Tashiro J, Yamazaki K, Nakamura Y, Miyazaki A, Bujo H, Saito Y, Kanno T, Maekawa M. Investigation of MDA-LDL (malondialdehyde-modified low-density lipoprotein) as a prognostic marker for coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*. 2015;450:145-50.
- Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Pawlak D, Buczek W. Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 2002;40(5):774-9.
- Kugaevskaya EV, Elisseeva YE. ACE inhibitors as activators of kinin receptors. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2010;4(4):309-20.
- Kusakabe T, Matsuda H, Kawakami T, Syoui N, Kurihara K, Tsukuda M, Takenaka T. Distribution of neuropeptide-containing nerve fibers in the human submandibular gland, with special reference to the difference between serous and mucous acini. *Cell Tissue Res*. 1997; 288(1):25-31.
- Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation*. 2003;107(2):346-54.

- Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation*. 2003;107(1):139-46.
- Lakatta EG. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation*. 2003;107(3):490-7.
- Lakschevitz F, Aboodi G, Tenenbaum H, Glogauer M. Diabetes and periodontal diseases: interplay and links. *Curr Diabetes Rev*. 2011;7(6):433-9.
- Lambert DW, Clarke NE, Turner AJ. Not just angiotensinases: new roles for the angiotensin-converting enzymes. *Cellular and molecular life sciences*. 2010;67(1):89-98.
- Lambert DW, Hooper NM, Turner AJ. Angiotensin-converting enzyme 2 and new insights into the renin-angiotensin system. *Biochemical pharmacology*. 2008;75(4):781-6.
- Lambert DW, Yarski M, Warner FJ, Thornhill P, Parkin ET, Smith AI, Hooper NM, Turner AJ. Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J Biol Chem*. 2005;280(34):30113-9.
- Lang CA, Mills BJ, Mastropaolo W, Liu MC. Blood glutathione decreases in chronic diseases. *J Lab Clin Med*. 2000;135(5):402-5.
- Langeveld B, Van Gilst WH, Tio RA, Zijlstra F, Roks AJ. Angiotensin-(1-7) attenuates neointimal formation after stent implantation in the rat. *Hypertension*. 2005;45(1):138-41.
- Lappin DF, Kjeldsen M, Sander L, Kinane DF. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. *J Periodontal Res*. 2000;35(6):369-73.
- Lavrentyev EN, Malik KU. High glucose-induced Nox1-derived superoxides downregulate PKC- β II, which subsequently decreases ACE2 expression and ANG (1-7) formation in rat VSMCs. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2009;296(1):H106-18.

- Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med.* 1993;329(20):1456-62.
- Lima DP, Diniz DG, Moimaz SA, Sumida DH, Okamoto AC. Saliva: reflection of the body. *Int J Infect Dis.* 2010; 14(3):e184-8.
- Lin YJ, Kwok CF, Juan CC, Hsu YP, Shih KC, Chen CC, Ho LT. Angiotensin II enhances endothelin-1-induced vasoconstriction through upregulating endothelin type A receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;451(2):263-9.
- Liu B, Dion MR, Jurasic MM, Gibson G, Jones JA. Xerostomia and salivary hypofunction in vulnerable elders: prevalence and etiology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;114(1):52-60.
- Liu J, Garcia-Cardena G, Sessa WC. Biosynthesis and palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase: mutagenesis of palmitoylation sites, cysteines-15 and/or-26, argues against depalmitoylation-induced translocation of the enzyme. *Biochemistry.* 1995;34(38):12333-40.
- Löfgren CD, Wickström C, Sonesson M, Lagunas PT, Christersson C. A systematic review of methods to diagnose oral dryness and salivary gland function. *BMC Oral Health.* 2012; 12:29.
- Lonn EM, Yusuf S, Jha P, Montague TJ, Teo KK, Benedict CR, Pitt B. Emerging role of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cardiac and vascular protection. *Circulation.* 1994;90(4):2056-69.
- Looms D, Tritsarlis K, Pedersen AM, Nauntofte B, Dissing S. Nitric oxide signalling in salivary glands. *Journal of oral pathology & medicine.* 2002;31(10):569-84.
- Lowenstein CJ, Michel T. What's in a name? eNOS and anaphylactic shock. *J Clin Invest.* 2006;116(8):2075-8.
- Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(5):3143-53.
- Lung MA. Autonomic nervous control of venous pressure and secretion in submandibular gland of anesthetized dogs. *Am J Physiol.* 1998; 275:G331-41.
- Luque M, Martin P, Martell N, Fernandez C, Brosnihan KB, Ferrario CM. Effects of captopril related to increased levels of prostacyclin and angiotensin-(1-7) in essential hypertension. *J Hypertens.* 1996;14(6):799-805.

- MaassenVanDenBrink A, de Vries R, Saxena PR, Schalekamp MA, Danser AH. Vasoconstriction by in situ formed angiotensin II: role of ACE and chymase. *Cardiovasc Res.* 1999; 44(2):407-15.
- Magrini F, Reggiani P, Roberts N, Meazza R, Ciulla M, Zanchetti A. Effects of angiotensin and angiotensin blockade on coronary circulation and coronary reserve. *Am J Med.* 1988;84(3A):55-60.
- Malicka B, Kaczmarek U, Skośkiewicz-Malinowska K. Prevalence of xerostomia and the salivary flow rate in diabetic patients. *Adv Clin Exp Med.* 2014;23(2):225-33.
- Malicka B, Kaczmarek U, Skośkiewicz-Malinowska K. Selected antibacterial factors in the saliva of diabetic patients. *Arch Oral Biol.* 2015;60(3):425-31.
- Mandel ID. The functions of saliva. *J Dent Res.* 1987;66:623-7.
- Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B1 receptors for kinins. *Pharmacological reviews.* 1998;50(3):357-86.
- Mariño R, Schofield M, Wright C, Calache H, Minichiello V. Self-reported and clinically determined oral health status predictors for quality of life in dentate older migrant adults. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2008;36(1):85-94.
- Matsuda H, Kusakabe T, Kawakami T, Nagahara T, Takenaka T, Tsukuda M. Neuropeptide-containing nerve fibres in the human parotid gland: a semiquantitative analysis using an antibody against protein gene product 9.5. *Histochem J.* 1997; 29(7):539-44.
- Matsuo R, Garrett JR, Proctor GB, Carpenter GH. Reflex secretion of proteins into submandibular saliva in conscious rats, before and after preganglionic sympathectomy. *J Physiol.* 2000; 527:175-84.
- Matsusaka T, Niimura F, Shimizu A, Pastan I, Saito A, Kobori H, Nishiyama A, Ichikawa I. Liver angiotensinogen is the primary source of renal angiotensin II. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2012;23(7):1181-9.
- Maxwell SR, Thomason H, Sandler D, Leguen C, Baxter MA, Thorpe GH, Jones AF, Barnett AH. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest.* 1997;27(6):484-90.

- McAllister BS, Leeblundberg LM, Javors MA, Olson MS. Bradykinin receptors and signal transduction pathways in human fibroblasts: integral role for extracellular calcium. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1993;304(1):294-301.
- Mese H, Matsuo R. Salivary secretion, taste and hyposalivation. *J Oral Rehabil*. 2007; 34(10):711-23.
- Metzger R, Bader M, Ludwig T, Berberich C, Bunnemann B, Ganten D. Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS letters*. 1995;357(1):27-32.
- Meurman JH, Tarkkila L, Tiitinen A. The menopause and oral health. *Maturitas*. 2009;63(1):56-62.
- Miners S, Ashby E, Baig S, Harrison R, Tayler H, Speedy E, Prince JA, Love S, Kehoe PG. Angiotensin-converting enzyme levels and activity in Alzheimer's disease: differences in brain and CSF ACE and association with ACE1 genotypes. *Am J Transl Res*. 2009;1(2):163-77.
- Minicucci EM, Pires RB, Vieira RA, Miot HA, Sposto MR. Assessing the impact of menopause on salivary flow and xerostomia. *Aust Dent J*. 2013;58(2):230-4.
- Minshall RD, Nakamura F, Becker RP, Rabito SF. Characterization of bradykinin B2 receptors in adult myocardium and neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation research*. 1995;76(5):773-80.
- Miricescu D, Greabu M, Totan A, Mohora M, Didilescu A, Mitrea N, Arsene AN, Spinu T, Totan C, Rădulescu R. Oxidative stress-a possible link between systemic and oral diseases. *Farmacia*. 2011;59(3):329-37.
- Mizui S, Aoki T, Hemmi H, Arita M, Sakai K, Aikawa A. Urinary angiotensin-converting enzyme 2 in patients with CKD. *Nephrology (Carlton)*. 2011;16(6):567-72.
- Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, I sar. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD (P) H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circulation research* 2002; 90(4): e58-e65.
- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England journal of medicine*. 1993;329(27):2002-12.

- Moncada SR, Palmer RM, Higgs E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological reviews*. 1991;43(2):109-42.
- Mooradian AD, Lung CC, Pinnas JL. Glycosylation enhances malondialdehyde binding to proteins. *Free Radic Biol Med*. 1996;21(5):699-701.
- Moore PA, Guggenheimer J, Etzel KR, Weyant RJ, Orchard T. Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;92(3):281-91.
- Moore S, Calder KA, Miller NJ, Rice-Evans CA. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free radical research*. 1994;21(6):417-25.
- Mulrow PJ. The intrarenal renin-angiotensin system. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 1993;2(1):41-4.
- Murray Thomson W, Poulton R, Broadbent JM, Al-Kubaisy S. Xerostomia and medications among 32-year-olds. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2006;64(4):249-254.
- Nagareddy PR, Soliman H, Lin G, Rajput PS, Kumar U, McNeill JH, MacLeod KM. Selective inhibition of protein kinase C beta(2) attenuates inducible nitric oxide synthase-mediated cardiovascular abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 2009;58(10):2355-64.
- Nagareddy PR, Xia Z, McNeill JH, MacLeod KM. Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(5):H2144-52.
- Nagler RM, Hershkovich O. Relationships between age, drugs, oral sensorial complaints and salivary profile. *Arch Oral Biol*. 2005;50(1):7-16.
- Nagler RM, Klein I, Zarzhevsky N, Drigues N, Reznick AZ. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002;32(3):268-77.
- Nagler RM, Salameh F, Reznick AZ, Livshits V, Nahir AM. Salivary gland involvement in rheumatoid arthritis and its relationship to induced oxidative stress. *Rheumatology*. 2003;42(10):1234-41.
- Nagler RM. Salivary glands and the aging process: mechanistic aspects, health-status and medicinal-efficacy monitoring. *Biogerontology*. 2004;5(4):223-33.

- Närhi TO, Meurman JH, Ainamo A, Nevalainen JM, Schmidt-Kaunisaho KG, Siukosaari P, i sar. Association between salivary flow rate and the use of systemic medication among 76-, 81-, and 86-year-old inhabitants in Helsinki, Finland. *J Dent Res.* 1992;71(12):1875-80.
- Närhi TO, Meurman JH, Ainamo A. Xerostomia and hyposalivation: causes, consequences and treatment in the elderly. *Drugs Aging.* 1999; 15(2):103-16.
- Närhi TO. Prevalence of subjective feelings of dry mouth in the elderly. *J Dent Res.* 1994; 73(1):20-5.
- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *The FASEB journal.* 1992;6(12):3051-64.
- Navazesh M, Brightman VJ, Pogoda JM. Relationship of medical status, medications, and salivary flow rates in adults of different ages. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996;81(2):172-6.
- Navazesh M, Christensen C, Brightman V. Clinical criteria for the diagnosis of salivary gland hypofunction. *J Dent Res.* 1992; 71(7):1363-9.
- Navazesh M, Christensen CM. A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures. *J Dent Res.* 1982; 61(10):1158-62.
- Navazesh M, Mulligan RA, Kipnis V, Denny PA, Denny PC. Comparison of whole saliva flow rates and mucin concentrations in healthy Caucasian young and aged adults. *J Dent Res.* 1992;71(6):1275-8.
- Navazesh M, Kumar SK. Measuring salivary flow: challenges and opportunities. *J Am Dent Assoc.* 2008; 139 Suppl:35S-40S.
- Nederfors T. Xerostomia and hyposalivation. *Adv Dent Res.* 2000;14:48-56.
- Nederfors T, Dahlof C, Ericsson T, Twetman S. Effects of the antihypertensive drug captopril on human salivary secretion rate and composition. *Eur J Oral Sci.* 1995;103(6):351-4.
- Nederfors T, Dahlöf C. Effects on salivary flow rate and composition of withdrawal of and re-exposure to the beta 1-selective antagonist metoprolol in a hypertensive patient population. *Eur J Oral Sci* 1996;104: 262-268.
- Nederfors T, Nauntofte B, Twetman S. Effects of furosemide and bendroflumethiazide on saliva flow rate and composition. *Arch Oral Biol* 2004;49: 507-513.

- Nguyen Dinh Cat A, Touyz RM. Cell signaling of angiotensin II on vascular tone: novel mechanisms. *Current hypertension reports*. 2011;13(2):122-8.
- Niki E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(4):503-15.
- Nolly HL, Lama MC, Carretero OA, Scicli AG. The kallikrein--kinin system in blood vessels. *Agents Actions Suppl*. 1992;38 (Pt 3):1-9.
- Norlén P, Ostberg H, Björn AL. Relationship between general health, social factors and oral health in women at the age of retirement. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1991;19(5):296-301.
- Oak JH, Cai H. Attenuation of angiotensin II signaling recouples eNOS and inhibits nonendothelial NOX activity in diabetic mice. *Diabetes*. 2007;56(1):118-26.
- Ohara Y, Hirano H, Yoshida H, Obuchi S, Ihara K, Fujiwara Y, Mataka S. Prevalence and factors associated with xerostomia and hyposalivation among community-dwelling older people in Japan. *Gerodontology*. 2016;33:20-27
- Ohkubo H, Nakayama K, Tanaka T, Nakanishi S. Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. *Journal of Biological Chemistry*. 1986;261(1):319-23.
- Olson S, Oeckler R, Li X, Du L, Traganos F, Zhao X, Burke-Wolin T. Angiotensin II stimulates nitric oxide production in pulmonary artery endothelium via the type 2 receptor. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2004;287(3):L559-68.
- Onuoha SC, Uzuegbu UE, Murphy A. Total Antioxidant Capacity (TAC) in Hypertensive Patients. *Asian Journal of Medical Sciences*. 2013;5(2):37-40.
- Opara EC, Abdel-Rahman E, Soliman S, Kamel WA, Souka S, Lowe JE, Abdel-Aleem S. Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. *Metabolism*. 1999;48(11):1414-7.
- Otteneeder MB, Knutson CG, Daniels JS, Hashim M, Crews BC, Rimmel RP, i sar. In vivo oxidative metabolism of a major peroxidation-derived DNA adduct, M1dG. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(17):6665-9.
- Ozkilic AC, Cengiz M, Ozaydin A, Cobanoglu A, Kanigur G. The role of N-acetylcysteine treatment on anti-oxidative status in patients with type II diabetes mellitus. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2006;17(4):245-54.

- Pacher P, Obrosova IG, Mabley JG, Szabó C. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. *Curr Med Chem*. 2005;12(3):267-75.
- Pan Z, Guzeldemir E, Toygar HU, Bal N, Bulut S. Nitric oxide synthase in gingival tissues of patients with chronic periodontitis and with and without diabetes. *J Periodontol*. 2010;81(1):109-20.
- Parvathy S, Oppong SY, Karran EH, Buckle DR, Turner AJ, Hooper NM. Angiotensin-converting enzyme secretase is inhibited by zinc metalloprotease inhibitors and requires its substrate to be inserted in a lipid bilayer. *Biochem J*. 1997;327 (Pt 1):37-43.
- Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*. 2003;333(1):19-39.
- Patel VB, Bodiga S, Basu R, Das SK, Wang W, Wang Z, Lo J, Grant MB, Zhong J, Kassiri Z, Oudit GY. Loss of Angiotensin-Converting Enzyme-2 Exacerbates Diabetic Cardiovascular Complications and Leads to Systolic and Vascular Dysfunction A Critical Role of the Angiotensin II/AT1 Receptor Axis. *Circulation research*. 2012;110(10):1322-35.
- Patel VB, Bodiga S, Fan D, Das SK, Wang Z, Wang W, Basu R, Zhong J, Kassiri Z, Oudit GY. Cardioprotective Effects Mediated by Angiotensin II Type 1 Receptor Blockade and Enhancing Angiotensin 1-7 in Experimental Heart Failure in Angiotensin-Converting Enzyme 2–Null Mice. *Hypertension*. 2012;59(6):1195-203.
- Paul M, Mehr AP, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological reviews*. 2006;86(3):747-803.
- Paul M, Wagner J, Dzau VJ. Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. Quantitative analysis by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Investigation*. 1993;91(5):2058.
- Paulais M, Turner RJ. Beta-adrenergic upregulation of the Na(+)-K(+)-2Cl- cotransporter in rat parotid acinar cells. *J Clin Invest* 1992;89: 1142-1147.
- Pechánová O. Contribution of captopril thiol group to the prevention of spontaneous hypertension. *Physiol Res*. 2007;56 Suppl 2:S41-8.

- Percival RS, Challacombe SJ, Marsh PD. Flow rates of resting whole and stimulated parotid saliva in relation to age and gender. *J Dent Res.* 1994;73(8):1416-20.
- Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2003;31 Suppl 1:3-23.
- Petrescu G, Costuleanu M, Slatineanu SM, Costuleanu N, Foia L, Costuleanu A. Contractile effects of angiotensin peptides in rat aorta are differentially dependent on tyrosine kinase activity. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2001; 2(3):180-7.
- Porter SR, Scully C, Hegarty AM. An update of the etiology and management of xerostomia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97(1):28-46.
- Preethi BP, Reshma D, Anand P. Evaluation of flow rate, pH, buffering capacity, calcium, total proteins and total antioxidant capacity levels of saliva in caries free and caries active children: an in vivo study. *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* 2010;25(4):425-8.
- Prins JM, Chao CK, Jacobson SM, Thompson CM, George KM. Oxidative stress resulting from exposure of a human salivary gland cells to paraoxon: an in vitro model for organophosphate oral exposure. *Toxicol In Vitro.* 2014;28(5):715-21.
- Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *J Agric Food Chem.* 2003;51(11):3273-9.
- Proctor GB, Carpenter GH. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Auton Neurosci.* 2007; 133(1):3-18.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1991;288(2):481-7.
- Radović K, Ilić J, Roganović J, Stojić D, Brković B, Pudar G. Denture stomatitis and salivary vascular endothelial growth factor in immediate complete denture wearers with type 2 diabetes. *J Prosthet Dent.* 2014;111(5):373-9.

- Rahbani-Nobar ME, Rahimi-Pour A, Rahbani-Nobar M, Adi-Beig F, Mirhashemi SM. Total antioxidant capacity, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in diabetic patients. *Med J Islamic Acad Sci.* 1999;12(4):109-4.
- Rai B, Kharb S, Jain R, Anand SC. Salivary lipid peroxidation product malonaldehyde in various dental diseases. *World J Med Sci.* 2006;1(2):100-1.
- Raidoo DM, Ramsaroop R, Naidoo S, Müller-Esterl W, Bhoola KD. Kinin receptors in human vascular tissue: their role in atheromatous disease. *Immunopharmacology.* 1997;36(2):153-60.
- Rani AJ, Mythili SV. Study on total antioxidant status in relation to oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(3):108-10.
- Redón J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, Sáez GT. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension.* 2003;41(5):1096-101.
- Reznick AZ, Shehadeh N, Shafir Y, Nagler RM. Free radicals related effects and antioxidants in saliva and serum of adolescents with Type 1 diabetes mellitus. *Archives of oral biology.* 2006;51(8):640-8.
- Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM. Evaluation of angiotensin converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J.* 2004;383(Pt 1):45-51.
- Richie JP Jr, Skowronski L, Abraham P, Leutzinger Y. Blood glutathione concentrations in a large-scale human study. *Clin Chem.* 1996;42(1):64-70.
- Riggins JN, Pratt DA, Voehler M, Daniels JS, Marnett LJ. Kinetics and Mechanism of the General-Acid-Catalyzed Ring-Closure of the Malondialdehyde-DNA Adduct, N²-(3-Oxo-1-propenyl) deoxyguanosine (N² OPdG-), to 3-(2'-Deoxy-β-d-erythro-pentofuranosyl) pyrimido [1, 2-α] purin-10 (3 H)-one (M1dG). *Journal of the American Chemical Society.* 2004;126(34):10571-81.
- Roganović J, Petrović N, Djukić L. Effect of neuropeptide Y on norepinephrine-induced constriction in the rabbit facial artery after carotid artery occlusion. *Vojnosanit Pregl.* 2014; 71(6):571-5.
- Roganović J, Djukić LJ, Kršljak E, Tanić N, Stojić D. Reduced muscarinic parotid secretion is underlain by impaired NO signaling in diabetic rabbits. *Oral Dis.* 2015;21(5):634-40.

- Roganović J, Radenković M, Tanić N, Tanić N, Petrović N, Stojić D. Impairment of acetylcholine-mediated endothelium-dependent relaxation in isolated parotid artery of the alloxan-induced diabetic rabbit. *Eur J Oral Sci.* 2011;119: 352-360.
- Rogerson FM, Chai SY, Schlawe I, Murray WK, Marley PD, Mendelsohn FA. Presence of angiotensin converting enzyme in the adventitia of large blood vessels. *Journal of hypertension.* 1992;10(7):615-20.
- Rogerson FM, Schlawe I, Paxinos G, Chai SY, McKinley MJ, Mendelsohn FA. Localization of angiotensin converting enzyme by in vitro autoradiography in the rabbit brain. *Journal of chemical neuroanatomy.* 1995;8(4):227-43.
- Roth G, Calmes R. *Oral biology. The C.V. The small Mosby Company vodi.* St. Louis, 1981, pp.196-236
- Rouleau JL, Chatterjee K, Bengt W, Parmley WW, Hiramatsu B. Alterations in left ventricular function and coronary hemodynamics with captopril, hydralazine and prazosin in chronic ischemic heart failure: a comparative study. *Circulation.* 1982;65:671-678.
- Rouleau JL, Chatterjee K, Bengt W, Parmley WW, Hiramatsu B. Alterations in left ventricular function and coronary hemodynamics with captopril, hydralazine and prazosin in chronic ischemic heart failure: a comparative study. *Circulation.* 1982;65(4):671-8.
- Ryan JW, Martin LC, Chung A, Pena GA. Mammalian inhibitors of angiotensin converting enzyme (kininase II). *Adv Exp Med Biol.* 1979;120B:599-606.
- Rybka J, Kupczyk D, Kędziora-Kornatowska K, Motyl J, Czuczejko J, Szewczyk-Golec K, Kozakiewicz M, Pawluk H, Carvalho LA, Kędziora J. Glutathione-related antioxidant defense system in elderly patients treated for hypertension. *Cardiovasc Toxicol.* 2011;11(1):1-9.
- Rybka J, Kupczyk D, Kędziora-Kornatowska K, Pawluk H, Czuczejko J, Szewczyk-Golec K, Kozakiewicz M, Antonioli M, Carvalho LA, Kędziora J. Age-related changes in an antioxidant defense system in elderly patients with essential hypertension compared with healthy controls. *Redox Rep.* 2011;16(2):71-7.

- Saito S, Hirata Y, Emori T, Imai T, Marumo F. Angiotensin II activates endothelial constitutive nitric oxide synthase via AT1 receptors. *Hypertension Research*. 1996;19(3):201-6.
- Saleh J, Figueiredo MA, Cherubini K, Salum FG. Salivary hypofunction: an update on aetiology, diagnosis and therapeutics. *Arch Oral Biol*. 2015; 60(2):242-55.
- Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg P Jr, Reed RL, Jones DP. Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med*. 1998;24(5):699-704.
- Sampaio WO, de Castro CH, Santos RA, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension*. 2007;50(6):1093-8.
- Sampaio WO, dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*. 2007;49(1):185-92.
- 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(1):27-34.
- Santos RA, e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(14):8258-63.
- Santos RA, Ferreira AJ, Simões e Silva AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2–angiotensin (1–7)–Mas axis. *Experimental physiology*. 2008;93(5):519-27.
- Schipper RG, Silletti E, Vingerhoeds MH. Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. *Arch Oral Biol*. 2007; 52(12):1114-35.
- Schuhmacher S, Oelze M, Bollmann F, Kleinert H, Otto C, Heeren T, Steven S, Hausding M, Knorr M, Pautz A, Reifenberg K, Schulz E, Gori T, Wenzel P, Münzel T, Daiber A. Vascular dysfunction in experimental diabetes is improved by pentaerythryl tetranitrate but not isosorbide-5-mononitrate therapy. *Diabetes*. 2011;60(10):2608-16.

- Sculley DV, Langley-Evans SC. Periodontal disease is associated with lower antioxidant capacity in whole saliva and evidence of increased protein oxidation. *Clinical Science*. 2003;105(2):167-72.
- Sculley DV, Langley-Evans SC. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2002;61(01):137-43.
- Scully C, Felix DH. Oral medicine -- update for the dental practitioner: dry mouth and disorders of salivation. *Br Dent J*. 2005; 199(7):423-7.
- Scully C. Drug effects on salivary glands: dry mouth. *Oral Dis*. 2003;9(4):165-76.
- Scully C, Bagan JV. Adverse drug reactions in the orofacial region. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(4):221-39.
- Sekhar RV, McKay SV, Patel SG, Guthikonda AP, Reddy VT, Balasubramanyam A, Jahoor F. Glutathione synthesis is diminished in patients with uncontrolled diabetes and restored by dietary supplementation with cysteine and glycine. *Diabetes Care*. 2011;34(1):162-7.
- Shaker O, Ghallab NA, Hamdy E, Sayed S. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in gingival tissues of chronic periodontitis with and without diabetes: immunohistochemistry and RT-PCR study. *Arch Oral Biol*. 2013;58(10):1397-406.
- Ship JA, Pillemer SR, Baum BJ. Xerostomia and the geriatric patient. *J Am Geriatr Soc*. 2002;50(3):535-43.
- Ship JA. Diagnosing, managing, and preventing salivary gland disorders. *Oral Dis*. 2002; 8(2):77-89.
- Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997;82(2):291-5.
- Siu GM, Draper HH. Metabolism of malonaldehyde in vivo and in vitro. *Lipids*. 1982;17(5):349-55.
- Smidt D, Torpet LA, Nauntofte B, Heegaard KM, Pedersen AM. Associations between oral and ocular dryness, labial and whole salivary flow rates, systemic diseases and medications in a sample of older people. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2011;39(3):276-88.
- Smith RG, Burtner AP. Oral side-effects of the most frequently prescribed drugs. *Spec Care Dentist*. 1994;14(3):96-102.

- Soinila J, Nuorva K, Soinila S. Nitric oxide synthase in human salivary glands. *Histochemistry and cell biology*. 2006;125(6):717-23.
- Soinila J, Nuorva K, Soinila S. Nitric oxide synthase in human salivary glands. *Histochem Cell Biol*. 2006;125(6):717-23.
- Sowers JR. Comorbidity of hypertension and diabetes: the fosinopril versus amlodipine cardiovascular events trial (FACET) *Am J Cardiol*. 1998;82(9B):15R-19R.
- Sreebny LM, Valdini A. Xerostomia. Part I: Relationship to other oral symptoms and salivary gland hypofunction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1988;66(4):451-8.
- Stojić D, Pesić S, Radenković M, Popović-Roganović J, Pesić Z, Grbović L. Responses of the human submandibular artery to ACh and VIP. *J Dent Res*. 2007; 86(6):565-70.
- Stojić D, Radenković M, Krsljak E, Popović J, Pesić S, Grbović L. Influence of the endothelium on the vasorelaxant response to acetylcholine and vasoactive intestinal polypeptide in the isolated rabbit facial artery. *Eur J Oral Sci*. 2003; 111(2):137-43.
- Stojić D, Roganović J, Brković B. Functionality of Orofacial Branches Feeding: Salivary Glands, Dental Pulp and Intraoral Anesthetic Field. Berhardt L. Ed. In: *Advances in Medicine and Biology*, vol 29. New York: Nova publishers, 2012; pp. 59-96
- Stojic D. Effects of captopril and bradykinin on chorda tympani-induced salivation in cat. *Eur J Oral Sci*. 1999; 107(1):21-4.
- Streckfus CF, Marcus S, Welsh S, Brown RS, Cherry-Peppers G, Brown RH. Parotid function and composition of parotid saliva among elderly edentulous African-American diabetics. *J Oral Pathol Med*. 1994;23(6):277-9.
- Streckfus CF, Wu AJ, Ship JA, Brown LJ. Stimulated parotid salivary flow rates in normotensive, hypertensive, and hydrochlorothiazide-medicated African-Americans. *J Oral Pathol Med* 1994;23: 280-283.
- Streckfus CF. Salivary function and hypertension: a review of the literature and a case report. *J Am Dent Assoc*. 1995;126(7):1012-7.

- Takemoto M, Egashira K, Usui M, Numaguchi K, Tomita H, Tsutsui H, Shimokawa H, Sueishi K, Takeshita A. Important role of tissue angiotensin-converting enzyme activity in the pathogenesis of coronary vascular and myocardial structural changes induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Journal of Clinical Investigation*. 1997;99(2):278.
- Terao J, Nagao A. Antioxidative effect of human saliva on lipid peroxidation. *Agricultural and biological chemistry*. 1991;55(3):869-72.
- Thakor AS, Brown CN, Edwards AV. Effects of prolonged reduction in blood flow on submandibular secretory function in anesthetized sheep. *J Appl Physiol* (1985). 2003; 95(2):751-7.
- Thomson WM, Chalmers JM, Spencer AJ, Ketabi M. The occurrence of xerostomia and salivary gland hypofunction in a population-based sample of older South Australians. *Spec Care Dentist*. 1999;19(1):20-3.
- Thomson WM. Issues in the epidemiological investigation of dry mouth. *Gerodontology*. 2005; 22(2):65-76.
- Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(43):33238-43.
- Tom B, Dendorfer A, Danser AJ. Bradykinin, angiotensin-(1-7), and ACE inhibitors: how do they interact?. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2003;35(6):792-801.
- Torpet LA, Kragelund C, Reibel J, Nauntofte B. Oral adverse drug reactions to cardiovascular drugs. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(1):28-46.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological reviews*. 2000;52(4):639-72.
- Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2003; 57(3): 145-155.
- Trauernicht AK, Sun H, Patel KP, Mayhan WG. Enalapril prevents impaired nitric oxide synthase-dependent dilatation of cerebral arterioles in diabetic rats. *Stroke*. 2003;34(11):2698-703.

- Trollet MR, Phillips MI. The effect of chronic bilateral nephrectomy on plasma and brain angiotensin. *Journal of hypertension*. 1992;10(1):29-36.
- Tulunoglu Ö, Demirtas S, Tulunoglu I. Total antioxidant levels of saliva in children related to caries, age, and gender. *International Journal of Paediatric Dentistry*. 2006;16(3):186-91.
- Turner AJ, Hooper NM. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2002;23(4):177-83.
- Turner MD, Ship JA. Dry mouth and its effects on the oral health of elderly people. *J Am Dent Assoc*. 2007; 138 Suppl:15S-20S.
- Turner RJ, Sugiya H. Understanding salivary fluid and protein secretion. *Oral Dis* 2002;8: 3-11.
- Turner S, Zettler G, Arcos ML, Cremaschi G, Davicino R, Anesini C. Effect of streptozotocin on reactive oxygen species and antioxidant enzyme secretion in rat submandibular glands: a direct and an indirect relationship between enzyme activation and expression. *Eur J Pharmacol*. 2011;659(2-3):281-8.
- Ueda S, Masumori-Maemoto S, Ashino K, Nagahara T, Gotoh E, Umemura S, Ishii M. Angiotensin-(1-7) attenuates vasoconstriction evoked by angiotensin II but not by noradrenaline in man. *Hypertension*. 2000; 35(4):998-1001.
- Ueda S, Masumori-Maemoto S, Ashino K, Nagahara T, Gotoh E, Umemura S, Ishii M. Angiotensin-(1-7) attenuates vasoconstriction evoked by angiotensin II but not by noradrenaline in man. *Hypertension*. 2000;35(4):998-1001.
- Urata H, Healy B, Stewart RW, Bumpus FM, Husain A. Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. *Circulation Research*. 1990;66(4):883-90.
- Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1996;271(38):23317-21.
- Vág J, Kerémi B, Hably C, Bartha J, Fazekas A. Angiotensin II type 1 (AT(1)) receptor blockade enhances the L-NAME-induced vasoconstriction in rat submandibular gland. *Exp Physiol*. 2002; 87(3):327-33.

- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
- van der Putten GJ, Brand HS, Schols JM, de Baat C. The diagnostic suitability of a xerostomia questionnaire and the association between xerostomia, hyposalivation and medication use in a group of nursing home residents. *Clin Oral Investig.* 2011;15(2):185-92.
- van Esch JH, Tom B, Dive V, Batenburg WW, Georgiadis D, Yiotakis A, van Gool JM, de Bruijn RJ, de Vries R, Danser AH. Selective angiotensin-converting enzyme C-domain inhibition is sufficient to prevent angiotensin I-induced vasoconstriction. *Hypertension.* 2005;45(1):120-5.
- Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res.* 2004; 38(3): 247-53.
- Vasconcelos AC, Soares MS, Almeida PC, Soares TC. Comparative study of the concentration of salivary and blood glucose in type 2 diabetic patients. *J Oral Sci.* 2010;52(2):293-8.
- Velez JC, Ierardi JL, Bland AM, Morinelli TA, Arthur JM, Raymond JR, Janech MG. Enzymatic processing of angiotensin peptides by human glomerular endothelial cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* 2012;302(12):F1583-94.
- Verano-Braga T, Schwämmle V, Sylvester M, Passos-Silva DG, Peluso AA, Etelvino GM, Santos RA, Roepstorff P. Time-resolved quantitative phosphoproteomics: new insights into angiotensin-(1-7) signaling networks in human endothelial cells. *Journal of proteome research.* 2012;11(6):3370-81.
- Vissink A, Spijkervet FK, Van Nieuw Amerongen A. Aging and saliva: a review of the literature. *Spec Care Dentist.* 1996;16(3):95-103.
- Vlková B, Stanko P, Minárik G, Tóthová Ľ, Szemes T, Baňasová L, Novotňáková D, Hodosy J, Celec P. Salivary markers of oxidative stress in patients with oral premalignant lesions. *Archives of oral biology.* 2012;57(12):1651-6.
- Votta-Velis EG, Minshall RD, Visintine DJ, Castellon M, Balyasnikova IV. Propofol attenuates endotoxin-induced endothelial cell injury, angiotensin-converting enzyme shedding, and lung edema. *Anesth Analg.* 2007;105(5):1363-70.

- Wang SL, Zhao ZT, Li J, Zhu XZ, Dong H, Zhang YG. Investigation of the clinical value of total saliva flow rates. *Arch Oral Biol.* 1998;43(1):39-43.
- Weismann D, Hartvigsen K, Lauer N, Bennett KL, Scholl HP, Issa PC, Cano M, Brandstätter H, Tsimikas S, Skerka C, Superti-Furga G. Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress. *Nature.* 2011;478(7367):76-81.
- Welches WR, Brosnihan KB, Ferrario CM. A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11. *Life sciences.* 1993;52(18):1461-80.
- West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med.* 2000;17(3):171-80.
- Wheatcroft SB, Williams IL, Shah AM, Kearney MT. Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabetic Medicine.* 2003;20(4):255-68.
- Whiting P, Nava S, Mozley L, Eastham H, Poat J. Expression of angiotensin converting enzyme mRNA in rat brain. *Molecular brain research.* 1991;11(1):93-6.
- Williams GH. Converting-enzyme inhibitors in the treatment of hypertension. *N Engl J Med.* 1988;319(23):1517-25.
- Woodman ZL, Oppong SY, Cook S, Hooper NM, Schwager SL, Brandt WF, Ehlers MR, Sturrock ED. Shedding of somatic angiotensin-converting enzyme (ACE) is inefficient compared with testis ACE despite cleavage at identical stalk sites. *Biochem J.* 2000;347 Pt 3:711-8.
- Wright JW, Harding JW. Important roles for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. *Brain Research Reviews.* 1997;25(1):96-124.
- Xu P, Costa-Goncalves AC, Todiras M, Rabelo LA, Sampaio WO, Moura MM, Santos SS, Luft FC, Bader M, Gross V, Alenina N. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. *Hypertension.* 2008;51(2):574-80.
- Yalçın F, Gurgan S, Gurgan T. The effect of menopause, hormone replacement therapy (HRT), alendronate (ALN), and calcium supplements on saliva. *J Contemp Dent Pract.* 2005;6(2):10-7.

- Yamada E, Endoh T, Suzuki T. Angiotensin II-induced inhibition of calcium currents via G(q/11)-protein involving protein kinase C in hamster submandibular ganglion neurons. *Neurosci Res.* 2002; 43(2):179-89.
- Yan C, Kim D, Aizawa T, Berk BC. Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide cyclic GMP as a key mediator. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2003;23(1):26-36.
- Yang CS, Tsai PJ, Chen WY, Liu L, Kuo JS. Determination of extracellular glutathione in livers of anaesthetized rats by microdialysis with on-line high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1995;667(1):41-8.
- Yang Z, Yu X, Cheng L, Miao LY, Li HX, Han LH, Jiang WP. Effects of enalapril on the expression of cardiac angiotensin-converting enzyme and angiotensin-converting enzyme 2 in spontaneously hypertensive rats. *Arch Cardiovasc Dis.* 2013;106(4):196-201.
- Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI, Aldini G. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Arch Biochem Biophys.* 2004;430(1):97-103.
- Yoshida K, Hirokawa J, Tagami S, Kawakami Y, Urata Y, Kondo T. Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia.* 1995;38(2):201-10.
- Yousif MH, Dhaunsi GS, Makki BM, Qabazard BA, Akhtar S, Benter IF. Characterization of Angiotensin-(1-7) effects on the cardiovascular system in an experimental model of type-1 diabetes. *Pharmacol Res.* 2012;66(3):269-75.
- Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 2000;342(3):145-53.
- Zalewska A, Knaś M, Gińdzieńska-Sieśkiewicz E, Waszkiewicz N, Klimiuk A, Litwin K, Sierakowski S, Waszkiel D. Salivary antioxidants in patients with systemic sclerosis. *Journal of Oral Pathology & Medicine.* 2014;43(1):61-8.

- Zappacosta B, Persichilli S, De Sole P, Mordente A, Giardina B. Effect of smoking one cigarette on antioxidant metabolites in the saliva of healthy smokers. *Arch Oral Biol.* 1999;44(6):485-8.
- Zhang H, Schmeisser A, Garlich CD, Plötze K, Damme U, Mügge A, Daniel WG. Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc Res.* 1999;44(1):215-22.
- Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1996;93(21):11968-73.

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Ljiljana Đukić je rođena 06.05.1986. godine u Beogradu. Gimnaziju „Branko Radičević“ završila je u Staroj Pazovi 2005. godine kao dobitnik diplome Vuk Karadžić. Na Stomatološki fakultet u Beogradu se upisala 2005/06 godine, a diplomirala je prva u generaciji 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,37 (devet i 37/100) u toku studija i ocenom 10 (deset) na diplomskom ispitu sa diplomskim radom iz Stomatološke farmakologije na temu: „Kserostomija izazvana antihipertenzivnim lekovima“. Tokom studija je više puta nagrađivana kao najbolji student godine i kao najbolje diplomirani student generacije Stomatološkog fakulteta u Beogradu. Dobitnik je nagrade Srpskog lekarskog društva za najbolje diplomiranog studenta Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu u šk. 2010/2011. godine i Povelje Univerziteta u Beogradu za izuzetan uspeh tokom studiranja za najboljeg studenta generacije Stomatološkog fakulteta u šk. 2010/2011. godini.

Obavezan lekarski staž obavila je u Domu zdravlja „Dr Jovan Jovanović Zmaj“ u Staroj Pazovi i deo staža na Stomatološkom fakultetu u Beogradu. Dr Đukić je položila stručni ispit za doktore stomatologije 30. novembra 2011. godine. Doktorske studije na modulu „Ćelijski i molekularni mehanizmi patogeneze i terapije oralnih oboljenja“ dr Đukić je upisala 2011/12 godine i uspešno položila sve obavezne predmete sa srednjom ocenom 9,83 na Stomatološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Za asistenta na predmetu Stomatološka farmakologija - naučna oblast Bazične stomatološke nauke prvi put je izabrana 2012. godine i učestvuje u izvođenju praktične nastave na osnovnim integrisanim studijama i strukovnim studijama za Oralne higijeničare.

Dr Ljiljana Đukić, kao saradnik, učestvuje u realizaciji naučnog projekta „Kontrola bola i molekularni mehanizmi kao faktori regenerativne terapije u stomatologiji kod zdravih i pacijenata sa dijabetes melitusom“ (Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Srbije, br. 175021). Član je Internacionalnog udruženja za istraživanja u stomatologiji (International Association for Dental Research - IADR) od 2013. godine. Do sada, dr Ljiljana Đukić je objavila i saopštila sedam radova, od čega tri rada u časopisima indeksiranim u Current Contents-u:

1. Roganović J, Petrović N , Djukić L. Effect of neuropeptide Y on the norepinephrine-induced constriction in the rabbit facial artery after carotid artery occlusion. *Vojnosanit Pregl* 2014; 71(6): 571-575 (M23)

2. Djukić L, Roganović J, Brajović MD, Bokonjić D, Stojić D. The effects of antihypertensives and type 2 diabetes on salivary flow and total antioxidant capacity. *Oral Dis.* 2015;21(5):619-25.(M21)
3. Roganović J, Djukić LJ, Kršljak E, Tanić N, Stojić D. Reduced muscarinic parotid secretion is underlain by impaired NO signaling in diabetic rabbits. *Oral Dis.* 2015;21(5):634-40. (M21)

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Ђукић Љиљана _____

број индекса _____ 4003/2011 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

"ACE инхибитори, еналаприл, и механизми оралне хомеостазе:

проток плјувачке и антиоксидативна заштита"

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

Потпис докторанда

У Београду, 29.02.2016. године

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора _____ Љиљана Ђукић

Број индекса _____ 4003/2011

Студијски програм _____ Докторске академске студије, модул: Ћелијски и
молекуларни механизми патогенезе и терапије оралних обољења

Наслов рада _____ "АСЕ инхибитори, еналаприл, и механизми оралне хомеостазе:
проток пљувачке и антиоксидативна заштита"

Ментор _____ Проф. Др Драгица Стојић

Потписани/а _____ Љиљана Ђукић

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, _____ 29.02.2016. године

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

"АСЕ инхибитори, еналаприл, и механизми оралне хомеостазе:

проток плувачке и антиоксидативна заштита"

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, 29.02.2016. године