

# Uloga melatonina u bolestima usne šupljine

---

**Barišić, Ivona**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Dental Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:127:258281>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**



*Repository / Repozitorij:*

[University of Zagreb School of Dental Medicine Repository](#)





Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Ivona Barišić

# **ULOGA MELATONINA U BOLESTIMA USNE ŠUPLJINE**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2022.

Rad je ostvaren na Zavodu za oralnu kirurgiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Mentor rada: Doc.dr.sc. Ivan Salarić, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Lektor hrvatskog jezika: Ana Dautović, univ. bacc. philol. angl. et univ. Bacc. philol. croat.

Lektor engleskog jezika: Ana Dautović, univ. bacc. philol. angl. et univ. Bacc. philol. croat.

Sastav Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_

Datum obrane rada: \_\_\_\_\_

Rad sadrži: 41 stranicu

1 tablicu

2 slike

1 CD

Rad je vlastito autorsko djelo, koje je u potpunosti samostalno napisano uz naznaku izvora drugih autora i dokumenata korištenih u radu. Osim ako nije drukčije navedeno, sve ilustracije (tablice, slike i dr.) u radu su izvorni doprinos autora diplomskog rada. Autor je odgovoran za pribavljanje dopuštenja za korištenje ilustracija koje nisu njegov izvorni doprinos, kao i za sve eventualne posljedice koje mogu nastati zbog nedopuštenog preuzimanja ilustracija odnosno propusta u navođenju njihovog podrijetla.

## **Zahvala**

Zahvaljujem mentoru, doc.dr.sc. Ivanu Salariću na susretljivosti, strpljenju i savjetima prilikom pisanja ovog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji, osobito roditeljima i sestri, na bezuvjetnoj podršci i ljubavi, što su bili uz mene i vjerovali u mene tijekom cijelog studija.

Hvala i „Ovim s početka abecede“- Barunki, Pavici, Petri, Karli i Jasmini koje su mi uljepšale studiranje i bile tu za mene; na ispijenim kavama (uključujući one s automata u NSB), ponavljanjima pred ispite, putovanjima i druženjima.

Želim se zahvaliti i profesorima, tetama iz referade i ostalim zaposlenicima Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## ULOGA MELATONINA U BOLESTIMA USNE ŠUPLJINE

### **Sažetak:**

Melatonin je molekula koju luči epifiza, ali i brojni drugi organi u tijelu, uključujući mrežnicu, koštanu srž, imunološke stanice, sluznicu gastrointestinalnog sustava, ali i žlijezde slinovnice. Melatonin posjeduje brojne fiziološke funkcije u organizmu, koje ostvaruje vezanjem za membranske i nuklearne receptore stanica. Zbog svoje amfifilnosti dospijeva u sve stanice i stanične odjeljke. Melatonin je prisutan i u usnoj šupljini; u slini i sulkularnoj tekućini, gdje ostvaruje lokalni učinak. Potiče aktivnost imunološkog sustava organizma, stimulacijom fagocitnih stanica; kontrolom lučenja citokina, leukotriena i prostaglandina regulira upalni odgovor; neutralizacijom slobodnih radikala štiti stanice od oksidativnog oštećenja. Ima bitnu ulogu u očuvanju koštanog zdravlja - inhibira osteoklastičnu resorpciju kosti i potiče osteoblaste na stvaranje nove kosti, lučenjem kolagena i drugih proteina koštanog matriksa.

Povoljni učinci melatonina zabilježeni su i u bolestima usne šupljine; smanjuje upalu i resorpciju kosti u parodontnoj bolesti, ubrzava oseointegraciju implantata i cijeljenje postekstrakcijske rane, posjeduje onkostatska svojstva – antiproliferativno, antiangiogeno, proapoptotično i imunostimulativno; smanjuje simptome oralnog mukozitisa uslijed kemo- i radio-terapije te ima antimikrobni učinak u virusnim i gljivičnim infekcijama usne šupljine.

**Ključne riječi:** melatonin, antioksidans, imunomodulator, parodontne bolesti, dentalni implantati

## **THE ROLE OF MELATONIN IN DISEASES OF THE ORAL CAVITY**

### **Summary:**

Melatonin is a molecule synthesized by the pineal gland, as well as by other organs, such as the retina, bone marrow, immune cells, and mucosa of the gastrointestinal tract, including the salivary glands. Melatonin exerts numerous physiological functions in the body, acting on the membrane and nuclear receptors of the cells. Due to its amphiphilic properties, it is able to enter all cells and cellular compartments. Melatonin is found in the oral cavity; in saliva, and in gingival crevicular fluid, where it exerts local effects. Melatonin activates the immune system by stimulating phagocytes; it regulates the inflammatory response by controlling cytokine, leukotriene, and prostaglandin secretion; by neutralizing the free radicals it protects the cells from oxidative damage. Melatonin has a vital role in bone health- it inhibits osteoclast-mediated bone resorption and it stimulates osteoblasts to synthesize new bone, which in turn secrete collagen and other proteins of the bone matrix.

Beneficial effects of melatonin in the diseases of the oral cavity have been reported; it diminishes inflammation and bone resorption in periodontal disease, accelerates dental implant osseointegration and post-extraction wound healing, it possesses oncostatic properties – antiproliferative, antiangiogenic, proapoptotic and immunostimulating; it reduces the severity of chemo- and radiotherapy-induced oral mucositis and it has antimicrobial effect against the viral and fungal infections of the oral cavity.

**Keywords:** melatonin, antioxidant, immunomodulator, periodontal diseases, dental implants

## Popis skraćenica

GIT	gastrointestinalni trakt
5-HTP	5-hidroksitriptofan
5-HT	5- hidroksitriptamin
NAT	N- acetiltransferaza
HIOMT	Hidroksiindol-O-metiltransferaza
SCN	suprahijazmatska jezgra
MT1	melatoninski receptor 1
MT2	melatoninski recptor 2
GPCR	engl. G protein coupled receptors – hrv. G protein spregnuti receptori
ROS	engl. Reactive Oxgen Species – hrv. reaktivni kisikovi spojevi
SR	slobodni radikali
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
ATP	adenozin trifosfat
RNS	engl. Reactive Nitrogen Species – hrv. reaktivni dušikovi spojevi
SOD	superoksid dismutaza
CAT	katalaza
GSH	glutation
IL-1 $\beta$	interleukin 1 beta
TNF- $\alpha$	čimbenik tumorske nekroze alfa
IL-2	interleukin 2
IFN- $\gamma$	interferon gama
COX	engl. Cixlooxygense – hrv. Ciklooksigenaza

NK stanice	engl. natural killer – hrv. Stanice ubojice
Th1 stanice	engl. T helper 1 – pomagački T limfociti 1
NF- $\kappa$ B	engl. Nuclear Factor Kappa Beta – hrv. jezgreni čimbenik kapa beta
OPG	osteoprotegerin
OCN	engl. Osteocalcine – hrv. Osteokalcin
OPN	osteopontin
BMP	engl. Bone Morphogenetic Protein – hrv. koštani morfogenetski protein
BSP	engl. Bone sialoprotein – hrv. koštani sijaloprotein
MMP	matriks metaloproteinaza
TRAP	engl. Tartarate-resistant acid phosphatase – hrv. kiselna fosfataza otporna na tartarat
RANKL	ligand receptora nuklearnog faktora kapa B
RANK	receptor aktivator nuklearnog faktora kapa B
VEGF	engl- Vascular Endothelial Growth Factor – hrv. čimbenika rasta vaskularnog endotela
HiF1 $\alpha$	hipoksijom inducibilan faktor alfa
LA	engl. linoleic acid – hrv. linoleična kiselina
13-HODE	engl. 13-hydroxioctadecadienic acid – 13 – hidroksioktadekadionska kiselina
mRNA	engl. messenger Ribonucleic acid – hrv. glasnička ribonukleinska kiselina
8-OHdG	8-hidroksigvanozin
GH	engl. Growth hormone – hrv. hormon rasta
FGF-2	engl. fibroblastic growth factor 2 – hrv. fibroblastični čimbenik rasta 2
BIC	engl. Bone to Implant Contact – hrv. kontakt između kosti i implantata
NFB	engl. Newly Formed Bone – hrv. novostvorena kost
ITB	engl. Interthread Bone – hrv. kosti između navoja implantata
BV/TV	engl. Bone Volume /Tissue Volume – hrv. odnos volumena kosti u ukupnom tkivu



## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. FIZIOLOGIJA MELATONINA.....	3
2.1. Metabolizam melatonina .....	4
2.2. Mehanizam djelovanja melatonina.....	7
2.3. Antioksidativni učinak melatonina .....	8
2.4. Imunomodulatorni učinak melatonina .....	10
2.5. Utjecaj melatonina na koštani metabolizam.....	11
3. MELATONIN U BOLESTIMA USNE ŠUPLJINE .....	15
3.1. Parodontne bolesti.....	16
3.2. Oralni karcinom .....	18
3.3. Melatonin i dentalni implantati.....	23
3.4. Melatonin i cijeljenje postekstrakcijske rane.....	26
3.5. Rekurentni aftozni stomatitis .....	26
3.6. Virusne infekcije usne šupljine.....	27
3.7. Kandidijaza .....	27
3.8. Karijes .....	27
3.9. Melatonin i kserostomija.....	28
4. RASPRAVA.....	29
5. ZAKLJUČAK .....	32
6. LITERATURA.....	34
7. ŽIVOTOPIS .....	40

## **1. UVOD**

Oralno zdravlje mjerilo je sveukupnog zdravlja i direktno utječe na dobrobit i kvalitetu života osobe. Podrazumijeva odsutnost orofacijalne boli, trauma, infekcija kao što su zubni karijes i parodontne bolesti, oralnih ulceracija, oralnog karcinoma te ostalih poremećaja i stanja koji umanjuju sposobnost obavljanja svakodnevnih funkcija otkidanja i žvakanja hrane, gutanja, komunikacije te time narušavaju psihosocijalno funkcioniranje pojedinca (1).

Brojne oralne bolesti povezane su sa različitom razinom upale; parodontitis koji predstavlja snažan imunski odgovor na uzročnike biofilma s posljedičnom resorpcijom potpornog aparata zuba; oralni karcinom koji je svojom patogenezom povezan sa oksidativnim stresom i oštećenjima na razini DNK; rekurentne aftozne ulceracije također su vezane uz slobodne kisikove radikale, kao i prekancerozne lezije leukoplakija i oralni lihen (2–4).

Jedan od primarnih ciljeva terapijskih postupaka u dentalnoj medicini je upravo smanjiti ili u potpunosti otkloniti upalu i omogućiti cijeljenje. Osim jasno definiranih i provjereno učinkovitih terapijskih modaliteta, postoji veliki broj pomoćnih tvari kojima se nastoji povećati terapijska uspješnost u mnogim granama dentalne medicine. Jedna od tvari koja se sve češće spominje je i melatonin.

Melatonin je endogeni indolamin, amfifilna molekula koju većinski sintetizira epifiza, noću u odsutnosti dnevnog svjetla. Najpoznatiji je zbog svoje povezanosti sa cirkadijanim ritmom i kontrolom perioda budnosti (5). Međutim, od njegova otkrića brojna su istraživanja dokazala i druge fiziološke funkcije melatonina, od kojih se ističu njegovo protuupalno, antioksidativno te imunomodulirajuće djelovanje (5). S obzirom na svoje karakteristike, primjena melatonina ima i terapijske implikacije u dentalnoj medicini te je danas predmet istraživanja, koja potvrđuju povoljan učinak melatonina na oralno zdravlje.

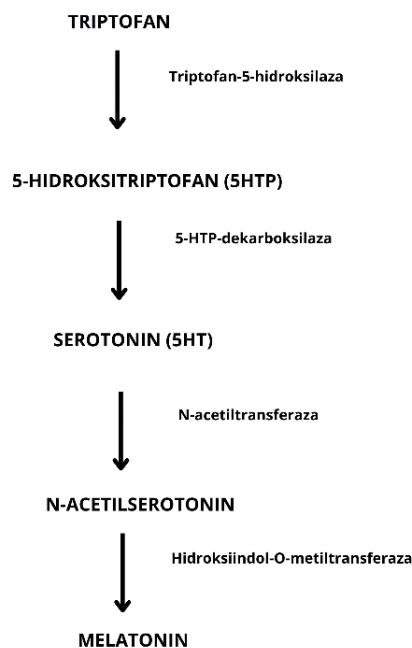
Svrha je ovog rada prema dostupnoj literaturi prikazati funkcije melatonina, mogućnosti i učinkovitost njegove primjene u liječenju različitih bolesti usne šupljine te cijeljenju nakon dentalnih zahvata.

## **2. FIZIOLOGIJA MELATONINA**

## 2.1. Metabolizam melatonina

Melatonin (N-acetil-5-metoksitriptamin) otkriven je u uzorku epifize goveda i okarakteriziran 1958.godine (5). Međutim, nakon toga, znatna proizvodnja melatonina uočena je u brojnim drugim tkivima, kao što su mrežnica, sluznica gastrointestinalnog trakta, koža, trombociti, koštana srž, imunološke stanice te druge strukture, uključujući žlijezde slinovnice i sluznicu usne šupljine; melatonin proizveden u gore navedenim organima ima lokalne učinke (2,5,6).

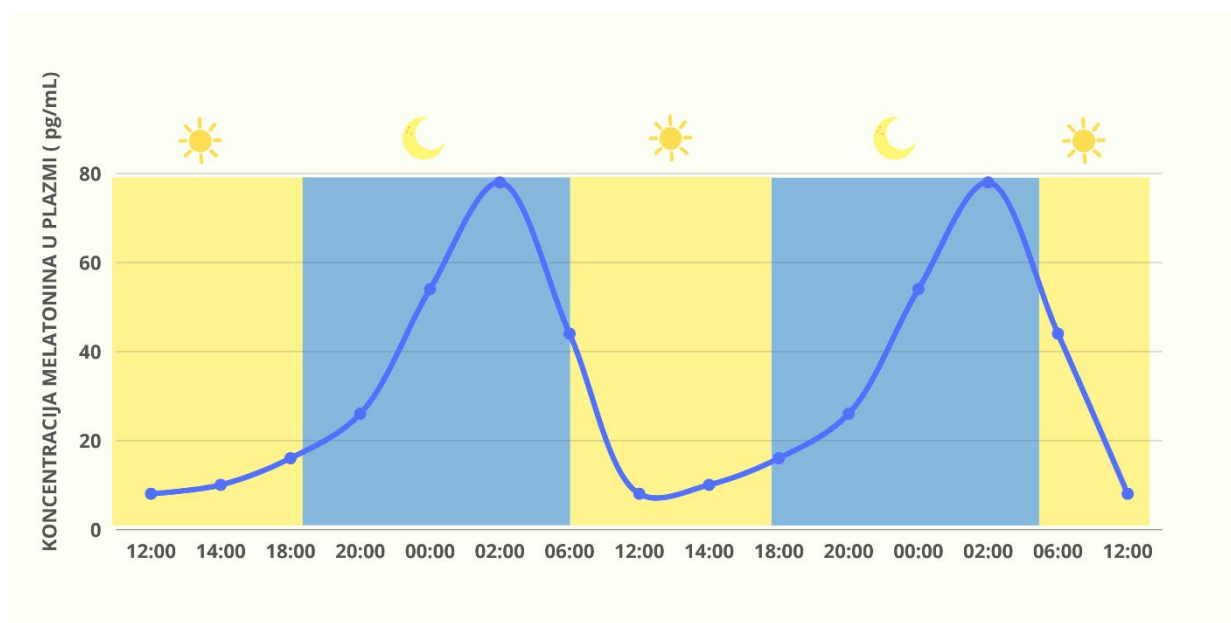
Melatonin nastaje iz aminokiseline triptofana koju stanice nakon unosa iz cirkulacije pretvaraju u serotonin (5-hidroksitriptamin), što uključuje enzime triptofan-5-hidroksilazu i 5-hidroksitriptofan- dekarboksilazu koji prvo hidroksiliraju, a zatim dekarboksiliraju triptofan. Noću se serotonin pretvara u melatonin u dva koraka; prvo enzim N-acetiltransferaza (NAT) acetilira serotonin i nastaje N-acetilserotonin. Zatim enzim hidroksiindol-O-metiltransferaza (HIOMT) metilira N-acetilserotonin pri čemu nastaje melatonin (7).



Slika 1: Sinteza melatonina iz aminokiseline triptofana

Melatonin je molekula izrazitog amfifilnog karaktera, ima visoku hidro- i lipo-solubilnost što joj omogućuje prolazak kroz stanične membrane u tijelu i široku distribuciju (5). Sekretija melatonina iz epifize odvija se noću, s maksimalnim plazmatskim koncentracijama između ponoći i dva sata (3).

Ritam lučenja melatonina je pod utjecajem noradrenalina koji se luči na simpatičkim živčanim završecima pinealocita. Informacija o periodu svjetlost-tama, odnosno dan-noć prenosi se od oka retinotalamičkim putem do suprahijazmatske jezgre (SCN) u hipotalamusu. Suprahijazmatska jezgra predstavlja biološki sat čovjeka i usklađuje sintezu melatonina s dnevnim svjetlom. Nakon zaprimljene fotičke informacije, SCN odašilje signal do epifize, gdje se nalazi posljednja sinapsa, u gornjem cervikalnom gangliju. Postganglijska simpatička vlakna otpuštaju noradrenalin i dolazi do aktivacije beta-adrenergičnih receptora na pinealocitima, te dolazi do večernjeg porasta u proizvodnji melatonina (2). Ovaj događaj započinje između 18 i 20 sati navečer, nakon toga koncentracija melatonina u plazmi raste i doseže najvišu razinu između ponoći i dva sata, postupno tokom noći pada te dosegne svoj minimum između 12 i 14 sati (3,8,9). Ograničavajućim faktorom u sintezi ovog neurohormona smatra se enzim NAT, jer tijekom dana svjetlost sprječava njegovu aktivaciju, što rezultira minimalnom dnevnom razinom melatonina u plazmi (2).



Slika 2: Dnevni ritam lučenja melatonina

Nakon što dospije u cirkulaciju, sedamdeset posto melatonina bude vezano za proteine plazme, dok preostali, slobodni melatonin (30%) može difundirati u okolna tkiva, uključujući usnu šupljinu. Melatonin u slini potječe od nevezanog cirkulirajućeg melatonina koji pasivnom difuzijom prolazi kroz stanične membrane mukoznih i acinarnih stanica velikih žlijezda slinovnica (parotidne, sublingvalne te submandibularne žlijezde). Odatle kontrakcijom mioepitelnih stanica acinusa i izvodnih kanalića dopire u usnu šupljinu. S obzirom da količina melatonina u slini ovisi o salivarnom protoku, kserostomija je vrlo vjerojatno povezana sa sniženim razinama melatonina u usnoj šupljini. Razina melatonina u slini iznosi 1-5 pg/mL danju, te 10-80 pg/mL noću, što je između 24 i 33 posto sistemske koncentracije slobodnog melatonina (5,6,10). Dnevni koncentracijski ritam salivarnog melatonina prati fluktuacije u koncentracijama serumskog melatonina. Stoga se melatonin u slini može smatrati pouzdanim pokazateljem funkcije epifize i promjena u biološkom satu (6).

Osim toga, i same žlijezde slinovnice vjerojatno proizvode melatonin. Nedavno su Shimozouma i suradnici imunohistokemijskim metodama na uzorku ljudske submandibularne žlijezde dokazali ekspresiju gena za enzime koji posreduju u proizvodnji melatonina. Tako je ekspresija enzima NAT i HIOMT dokazana na prugastim kanalićima te epitelnim stanicama žlijezde. To su enzimi odgovorni za pretvorbu serotonina u melatonin. Prisutnost melatonina zabilježena je i u gingivalnoj krevikularnoj tekućini u ljudi, što su učinili Srinath i suradnici. Razina melatonina mjerena danju u sulkularnoj tekućini zdravih ispitanika (bez gingivitisa) iznosila je 1,54 pg/mL u odnosu na 2,17 pg/mL izmjerenih u slini. Kako je već ranije navedeno, i imunološke stanice sposobne su samostalno proizvoditi melatonin, a lamina propria gingive i parodonta često sadrži imunokompetentne stanice, stoga je moguće da i one u određenoj mjeri pridonose ukupnoj količini melatonina izlučenog u usnu šupljinu (6). S obzirom da je upala velika komponenta brojnih oralnih bolesti, oralno dostupan melatonin mogao bi imati ulogu u kontroli upale gingive.

Primarno mjesto razgradnje melatonina u 6-hidroksimelatonin i 6-sulfatoksimelatonin odvija se u jetri, a spojevi se kasnije izlučuju bubrezima. Koncentracija 6-hidroksimelatonina podudara se sa plazmatskom koncentracijom melatonina i može poslužiti kao mjerilo aktivnosti epifize (11).

## 2.2. Mehanizam djelovanja melatonina

Melatonin ostvaruje veći dio svoje funkcije djelujući preko dvije skupine membranskih receptora: MT1 i MT2, članova obitelji G-protein spregnutih transmembranskih receptora (*engl. GPCR – G protein coupled receptors*). Aktivacijom melatoninskih receptora dolazi do aktivacije fosfolipaza A2 i inhibicije adenilat i gvanilil ciklaza, unutarstaničnih signalnih putova (6). Melatoninski receptori nalaze se na svim tjelesnim stanicama, a njihov broj reguliran je negativnom povratnom spregom (5). Shodno tome, melatoninski receptori pronađeni su i parotidnoj žlijezdi životinjskog modela, kada je primijenjeni antagonist melatonina, luzindol, inhibirao sintezu melatonina u štakora. U epitelu usne šupljine detektirana je samo jedna skupina, i to MT1 receptori (6).

Osim učinka koji ostvaruje posredno preko ranije spomenutih receptora, melatonin zbog svoje male i lipofilne strukture s lakoćom prolazi stanične membrane; nađen je u visokim koncentracijama u mitohondrijima stanice, može se vezati za proteine citoplazme poput kalmodulina, kalretikulina i protein kinaze C, ali ima i direktan učinak na staničnu jezgru, kao steroidni ili tiroidni hormoni. Istraživanja su pokazala da je imunomodulatorni učinak melatonina povezan upravo s njegovim djelovanjem na receptore u staničnoj jezgri (5,10,12).

Melatonin ima još jednu funkciju, onu antioksidativnu, gdje direktno neutralizira slobodne kisikove i dušikove radikale koji nastaju u brojnim upalnim bolestima, te povećava dostupnost drugih antioksidansa u organizmu, poput glutationa ili superoksid dismutaze (7). Taj učinak događa se direktno, neovisno o membranskim receptorima.

Melatonin se ne može okarakterizirati kao hormon u klasičnom smislu riječi, jer nema jedan jasno definiran mehanizam djelovanja, ne postoji samo jedan organ u kojem nastaje i ne postoji jedno ciljno mjesto djelovanja te se osim hormonom smatra snažnim zaštitnikom stanica od molekularnog oštećenja (13).



## 2.3. Antioksidativni učinak melatonina

### 2.3.1. Oksidativni stres i upala

Reaktivni kisikovi spojevi (eng. *ROS – reactive oxygen species*), ili jednostavno slobodni radikali (SR) su molekule ili dijelovi molekula koji posjeduju jedan nespareni elektron u svojoj vanjskoj orbiti. To deficitarno stanje čini ih izrazito reaktivnima i nestabilnim. Nastoje se stabilizirati doniranjem ili primanjem jednog elektrona, pritom reagirajući s okolnim molekulama. Posljedično, oštećuju brojne biološke molekule (vitamine, proteine, lipide i ugljikohidrate, nukleinske kiseline), ali i stanične strukture (13). ROS uzrokuju lipidnu peroksidaciju i formiranje visoko toksičnih lipidnih radikala i metabolita koji mogu dovesti do staničnog oštećenja. Slobodni radikali često oštećuju proteine, što narušava njihovu ulogu u staničnoj signalizaciji, kontroli staničnih ciklusa i metabolizma; oštećenjem nukleinskih kiselina mogu dovesti do mutacija DNK i pridonijeti razvoju raznih tumora, neurodegenerativnih i autoimunih bolesti (3).

Stanice koriste kisik za proizvodnju 90 do 95 posto ukupne energije u obliku ATP-a. Glavni izvor energije su mitohondriji koji u procesu transporta elektrona pretvara redoks energiju u gradijent protona koji dovodi do sinteze ATP pomoću ATP – sintaze. U idealnim uvjetima, svi elektroni, njih 4, bili bi predani kisiku što bi rezultiralo nastankom vode. Stoga je glavna uloga kisika u procesima proizvodnje energije konačno prihvaćanje elektrona. Međutim, u normalnim okolnostima, to se ne događa, već oko 5 posto ukupno potrošenog kisika primi jedan, dva ili tri elektrona i nastanu superoksidni anion ( $O_2^-$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i iznimno reaktivni hidroksilni radikal ( $OH^-$ ) (3,13).

Kisikovi radikali mogu reagirati sa dušikovim oksidom (NO) i formirati reaktivne dušikove spojeve (eng. *RNS – reactive nitrogen species*), koji uključuju nitroksilni anion ( $NO^-$ ) i peroksinitrit ( $ONOO^-$ ). Peroksinitrit je posebno toksičan jer inhibira mitohondrijsku proizvodnju energije i može dovesti do proizvodnje SR i stanične smrti (3).

Srećom, biološki sustavi imaju antioksidativne mehanizme kojima neutraliziraju potencijalno štetne učinke slobodnih kisikovih i dušikovih radikala. Ti mehanizmi mogu se podijeliti u neenzimatske sustave malih molekula koje direktno neutraliziraju slobodne radikale, kao što su glutathion (GSH), vitamini A, C i E te na posredne, enzimatske sustave u koje spadaju superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i razne peroksidaze (13).

Kada antioksidativni sustavi ne eliminiraju slobodne radikale, ili kada su oni u suvišku, dolazi do biokemijske neravnoteže slobodnih radikala i antioksidansa, odnosno nastaje oksidativni stres. Oksidativni stres ima implikacije u homeostazi organizma jer SR oštećuju biološke molekule u reakcijama s njima. Izravno je povezan s upalom, jer ROS potiču aktivaciju transkripcijskih faktora koji posljedično povećavaju proizvodnju proupalnih citokina, kao što je to interleukin  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) ili čimbenik tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ) te drugih upalnih medijatora poput ciklooksigenaze 2 (COX-2). Reaktivni kisikovi spojevi i upala poznati su u patogenezi brojnih kroničnih bolesti, poput ateroskleroze, Alzheimerove bolesti, dijabetesa te parodontne bolesti, ali i u patogenezi nekih drugih oralnih bolesti poput rekurentnog aftoznog stomatitisa, leukoplakije i oralnog lihen planusa (3,4).

#### 2.3.4 Melatonin kao antioksidans

Melatonin je jedan od najsnažnijih antioksidansa u organizmu; procjenjuje se da je sposoban neutralizirati do 10 molekula slobodnih radikala. Zbog svoje amfifilnosti, melatonin dospijeva u sve stanice i stanične strukture, što nije slučaj s drugim antioksidansima. Ima veliki afinitet za mitohondrije i svojim djelovanjem stabilizira njihovu unutarnju membranu te omogućuje rad mitohondrijskih enzima u proizvodnji energije. U odnosu na druge antioksidanse, melatonin ima i izravan učinak na imunološki sustav (4,13).

Melatonin ostvaruje svoje antioksidativno djelovanje direktno - predajući jedan svoj elektron OH- radikalu; na taj način ga stabilizira i sprječava njegovu reakciju s biološkim molekulama. Tim procesom melatonin i sam postaje radikal, indolski kationski radikal koji dalje reagira sa sljedećom molekulom OH- (13).

Kao antioksidans, melatonin djeluje i posredno, povećavajući dostupnost ostalih antioksidansa u organizmu. Dokazano je da melatonin u fiziološkim i farmakološkim dozama potiče ekspresiju gena za enzime glutation peroksidazu, superoksid dismutazu i katalazu. Također smanjuje ekspresiju enzima NO sintetaze i na taj način regulira proizvodnju NO, koji ako je u suvišku, može poslužiti za stvaranje ROS i RNS (3).

#### **2.4. Imunomodulatorni učinak melatonina**

Sinteza melatonina zabilježena je u raznim tkivima, uključujući i imunološki sustav. Melatonin i njegovi membranski i nuklearni receptori pronađeni su u timusu, na mastocitima, NK stanicama, eozinofilima i neutrofilima, trombocitima te endotelnim stanicama (12). Dokazana je i značajna proizvodnja melatonina u ljudskim limfocitima; gdje je djelovao intra, auto- i parakrino, preko membranskih i/ili nuklearnih receptora (12). García-Mauriño i suradnici (14) dokazali su da melatonin potiče proizvodnju IL-2 i IL-6 u limfocitnim i monocitnim staničnim linijama vezanjem za membranske i nuklearne receptore.

Brojne su studije potvrdile regulatorni učinak melatonina na prirodenu imunost. Melatonin potiče stvaranje progenitornih stanica makrofaga i granulocita, te ostalih krvnih stanica (15).

Melatonin regulira imunostni sustav kontrolom lučenja citokina iz imunokompetentnih stanica. Stimulira proizvodnju IL-2, IL-6 i IFN- $\gamma$  u mononuklearnim stanicama. Osim toga, aktivacijom monocita preko svojih receptora, potiče proizvodnju IL-1, TNF- $\alpha$  i ROS i na taj način povećava njihovu citotoksičnost prilikom fagocitoze (15).

Također potiče proizvodnju IL-12 u monocitima. IL-12 stimulira proizvodnju Th1 stanica; one pak luče IL-2 i IFN- $\gamma$  koji potiču daljnju aktivnost makrofaga i neutrofila. Th stanice također su aktivirane melatoninskim receptorima (15).

Melatonin povećava aktivnost i broj cirkulirajućih NK stanica, što je rezultat stimulacije NK stanica od strane Th1 stanica, IL-2, IL-6 i IL-12 te IFN- $\gamma$ . NK stanice imaju funkciju prirodene imunosti i ulogu u fagocitozi brojnih mikroorganizama, uključujući viruse, ali i u fagocitozi tumorskih stanica (15).

Makrofazi prilikom obavljanja svoje funkcije proizvode znatne količine ROS; što povećava razine NO i omogućava sintezu RNS. Melatonin kontrolira razinu NO inhibicijom NO sintetaze (15). Osim toga, ROS mogu potencirati daljnji upalni odgovor stimulacijom gena uključenih u upalu. Jedan od mehanizama kojim se to ostvaruje je aktivacijom transkripcijskog čimbenika NF- $\kappa$ B (4,7). Njegova aktivacija dovodi do proizvodnje raznih proupalnih medijatora – citokina, TNF- $\alpha$ , NO sintetaze i adhezijskih molekula (3,7). Melatonin ostvaruje protuupalno djelovanje inhibicijom vezanja NF- $\kappa$ B za jezgru, ali i neutralizacijom ROS sprječava aktivaciju NF- $\kappa$ B (4).

Melatonin dodatno sprječava inhibitorni učinak PG-E2 u proizvodnji IL-2 u ljudskim limfocitima, djelujući preko MT1 receptora (15).

Melatonin ostvaruje protuupalni učinak i kao endogeni inhibitor ciklooksigenaze (16). Naime, učinak melatonina uspoređivan je sa nesteroidnim protuupalnim lijekom (NSAID), indometacinom, na modelu edema mišje šape; pritom nisu pronađene statističke razlike u učinkovitosti između melatonina i indometacina. Dokazano je vezanje melatonina za mjesta na COX-1 i COX-2 enzimima, koji sudjeluju u sintezi upalnih medijatora.

Osim na staničnu, melatonin ima pozitivan učinak i na humoralnu imunost; potičući lučenje IL-4 koji stimulira B limfocite, ali i sprječavanjem apoptoze prekursora B limfocita u koštanoj srži (3,15).

S druge strane, zabilježeni su dvosmisleni podaci o ulozi melatonina u regulaciji upalnog i imunološkog odgovora. U pojedinim modelima melatonin je potaknuo lučenje proupalnih medijatora, dok se u drugim modelima primjenom melatonina znatno smanjila proizvodnja upalnih citokina. Jedno objašnjenje je dualna narav slobodnih radikala u organizmu; potrebni su u fagocitozi za antibakterijski učinak, ali ako su u suvišku dovode do potenciranja upalnog odgovora. Osim toga, inicijalne razlike u imunološkim stanicama modela, vrsta tkiva zahvaćenog upalom i podležeća patofiziologija mogu dodatno objasniti diskrepancu između rezultata (3).

## **2.5. Utjecaj melatonina na koštani metabolizam**

Kost je dinamično tkivo, u stalnoj sintezi i resorpciji, to jest remodelaciji, procesu koji se u normalnim uvjetima odvija uravnoteženo i omogućuje obnovu 5-15% ukupne koštane mase godišnje (17).

Remodelacija kosti sastoji se od resorpcije prethodno određene količine kosti posredovanjem osteoklasta, stvaranjem osteoidnog matriksa od strane osteoblasta te njegovom kasnijom mineralizacijom. Ovaj proces odvija se na malom području kortikalne kosti ili na površini trabekularne kosti, zvanom BMU (*engl. Basic Multicellular Unit* - osnovna multicelularna jedinica). Koštano tkivo sastoji se od specijaliziranih stanica, organske matrice i mineralne faze.

Postoje različite vrste stanica u koštanom tkivu, a potječu iz jedne od dvije stanične linije – pluripotentnih mezenhimalnih stanica (matičnih stanica koštane srži) i monocitno-makrofagne stanične linije koštane srži.

Osteoblasti su stanice koje proizvode, odlažu i mineraliziraju međustaničnu tvar te reguliraju aktivnost osteoklasta. Potječu od matičnih stanica koštane srži; tijekom svog sazrijevanja prolaze nekoliko faza i pritom izražavaju različite proteine na svojoj površini, koji mogu poslužiti kao indikatori njihove aktivnosti. Jedan od najvažnijih regulatora diferencijacije osteoblasta je koštani morfogenetski protein (*engl. BMP – bone morphogenetic protein*). Kolagen tipa 1 i osteopontin (OPN) nalaze se na površini osteoprogenitornih stanica u ranoj fazi diferencijacije. Isto tako, alkalna fosfataza (AP- *engl. alkaline phosphatase*) je enzim koji sudjeluje u proliferaciji i migraciji osteoblasta te je povećana njegova ekspresija na početku mineralizacije. Koštani sijaloprotein (BSP - *engl. bone sialoprotein*) i osteokalcin (OCN – *engl. osteocalcin*) su markeri zrelih osteoblasta koji luče koštani matriks, i javljaju se na početku mineralizacije koštanog matriksa (18).

Najveći dio osteoblasta nakon mineralizacije umire apoptozom, jedan dio postaju obložne stanice, a jedan manji dio ostane zarobljen u mineraliziranom matriksu – osteociti. Oni također sudjeluju u osteogenezi i eksprimiraju koštane biljege, ali njihova bitnija uloga je kontrola remodelacije kosti – detektirajući promjene u mehaničkom opterećenju kosti.

Stanice koje su odgovorne za resorpciju kosti su osteoklasti, koje potječu od monocitno-makrofagne stanične linije. Riječ je o velikim, multitnukleiranim stanicama koje na svojoj membrani imaju dvije specijalizirane strukture, nabrani rub (*engl. ruffled border*), gdje se odvija resorpcija kosti, i integrine kojima se osteoklasti sidre za kost. Integrini osteoklasta prepoznaju slijed aminokiselina proteina koštanog matriksa, poput kolagena i glikoproteina osteopontina i sijaloproteina (17,18). Aktivirani osteoklasti izlučuju kiselinu (H<sup>+</sup>), matriksne metaloproteinaze (MMP), kiselu fosfatazu otpornu na tartarat (TRAP, *engl. tartarate-resistant acid phosphatase*) i hidrolitičke enzime kao što je katepsin K i glukuronidaza (18). Time se pH prostora između nabranog ruba i površine kosti snizuje, što rezultira otapanjem organske matrice i mineraliziranog tkiva (18).

Poznato je da osteoklastogenezu reguliraju osteoblasti. Oni luče čimbenik stimulacije kolonije makrofaga (M-CSF) potreban u ranim fazama osteoklastogeneze (18). Trenutna saznanja o kontroli osteoklastogeneze temelje se na postojanju 3 ključne molekule, a to su: OPG (osteoprotegerin), RANKL (ligand receptora aktivatora NF- $\kappa$ B, smješten na površini preosteoblasta i osteoblasta) i RANK (receptor aktivator NF- $\kappa$ B smješten na membrani osteoklasta i preosteoklasta) (18). RANKL je citokin koji pripada obitelji čimbenika tumorske nekroze (TNF). Rezultat vezanja RANKL-a za RANK je aktivacija i diferencijacija osteoklasta i posljedična resorpcija kosti. Međutim, učinak RANKL-a inhibira OPG, cirkulirajuća

bjelančevina također iz obitelji TNF proteina, koju proizvode osteoblasti i preosteoblasti. Kada se OPG veže za RANK, sprječava interakciju RANKL-RANK i time inhibira osteoklastogenezu (18).

Organski matriks sastoji se od bjelančevina, najvećim dijelom kolagena (90%) tipa I te tipa V. Preostali dio matriksa čine drugi proteini: proteoglikani poput hijaluronske kiseline i hondroitin sulfata; glikoproteini osteonektin (ON), osteopontin (OPN), alkalna fosfataza (AP), i koštani sijaloprotein (BSP) (19). Mineralizirana faza čini 65 posto koštane mase, sastoji se od malih kristala hidroksiapatita te u manjim količinama minerala magnezija, natrija, kalija, mangana i fluora (18,19).

Melatonin sudjeluje u kontroli koštanog metabolizma na 2 osnovna načina: poticanjem stvaranja nove kosti i inhibicijom resorpcije kosti (19).

Dokumentirane su brojne studije o povezanosti melatonina i proizvodnje nove kosti (20–22). U tim je istraživanjima melatonin djelovao parakrino na okolne stanice, kao lokalni čimbenik rasta (19). Bitna uloga melatonina je u formiranju osteoprogenitornih stanica. Dokazan je njegov stimulatorni učinak na proliferaciju i diferencijaciju ljudskih osteoblasta *in vitro*, ali i ubrzano sazrijevanje osteoblasta - nakon 12 dana, umjesto uobičajenih 21 dan (20,21). Osim toga dokazano je da melatonin potiče proizvodnju kolagena tipa 1, ali i da je nakon 5-9 dana potaknuo ekspresiju drugih proteina koštanog matriksa – poput AP, OCN i BSP (20,21). Dodatno je zabilježena i povišena aktivnost alkalne fosfataze u ljudskim mezenhimalnim stanicama uzgojenim u osteogenom mediju sa melatoninom; i to djelovanjem preko MT2 receptora (22). Alkalna fosfataza je bitan protein u diferencijaciji osteoblasta, ali i mineralizaciji koštanog matriksa (18).

Drugi, potencijalno bitniji mehanizam kojim melatonin djeluje na očuvanje koštane mase je inhibicijom resorpcije kosti, i to na nekoliko razina. Koyama i suradnici dokazali su da melatonin smanjuje ekspresiju RANKL-a i time sprječava osteoklastogenezu (23); nakon što je u farmakološki primijenjenim dozama zabilježena povećana gustoća kosti te debljina trabekularne kosti na modelima miševa. Osim toga, utvrđen je i učinak melatonina na broj Howshipovih lakuna gdje je pronađen značajno manji broj i smanjena površina osteoklastičnih lakuna u melatoninskoj skupini (23). Broj lakuna predstavlja broj formiranih osteoklasta, a površina resorpcijskih lakuna aktivnost osteoklasta, iz čega se može zaključiti da primjena melatonina sprječava osteoklastogenezu, ali i aktivnost osteoklasta u lakunama. Inhibitorni učinak melatonina na resorpciju kosti može se objasniti i antioksidativnim učinkom melatonina.

Prilikom resorpcije kosti, osteoklasti luče razne enzime, među kojima i kiselu fosfatazu otpornu na tartarat (TRAP). Pritom dolazi do stvaranja velikih količina radikala, osobito superoksidnog radikala ( $O_2^-$ ) koji dovode do otapanja proteina koštanog matriksa, ali i aktivacije novih osteoklasta (24–26). Melatonin stoga djeluje i na razini osteoklastičnih lakuna te neutralizacijom SR inhibira daljnju aktivaciju osteoklasta i resorpciju kosti (6,24).

Osim toga, Koyama i suradnici (23) detektirali su i pojačanu transkripciju OPG-a te povećanu razinu proteina OPG-a u osteoblastičnoj staničnoj liniji miševa. Osteoprotegerin (OPG) je proizvod osteoblasta i ima visoki afinitet za RANK, pri čemu onemogućuje interakciju RANKL-RANK i osteoklastogenezu (18).

### **3. MELATONIN U BOLESTIMA USNE ŠUPLJINE**



### 3.1. Parodontne bolesti

Parodontna bolest označava upalu gingive, parodontnog ligamenta i alveolarne kosti praćenu gingivalnim krvarenjem, formiranjem parodontnih džepova i resorpcijom vezivnotkivnog pričvrstka. Bolest započinje kao gingivitis, upalni odgovor na bakterije i toksine dentalnog biofilma. Neliječen, gingivitis nakon izvjesnog vremena može prijeći u svoj kronični oblik, parodontitis. U težim slučajevima parodontitis može rezultirati resorpcijom kosti i gubitkom zuba (9).

Bitan aspekt u parodontnoj bolesti je proizvodnja slobodnih radikala; dio njih potječe od bakterija biofilma, a drugi dio od disproporcionalno snažnog imunskog odgovora potaknutog bakterijskim toksinima, što posljedično ima povećanje upalnih medijatora i destrukciju tkiva (27).

Mehanizam kojim nastaju gingivitis, parodontitis te resorpcija alveolarne kosti je sljedeći: gram-negativne bakterije zubnog kamenca luče lipopolisaharid (LPS), što započinje kaskadu upalnih reakcija. Dolazi do povećane proizvodnje proupalnih citokina- interleukina 1 (IL-1), čimbenika tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ) i proizvodnje slobodnih kisikovih radikala (SR). Nastaje oksidativni stres, koji dovodi do aktivacije matriks metaloproteinaza (MMP), enzima koji razgrađuju kolagen pričvrstnog aparata. Polimorfonuklearni leukociti (neutrofil) migiriraju prvi na mjesto upale, te zajedno sa makrofazima, PGE<sub>2</sub> i LPS generiraju dodatne slobodne kisikove radikale. Sve to u konačnici rezultira aktivacijom osteoklasta koji resorbiraju kost. Pronađeno je da melatonin interferira i s aktivnošću LPS-a; ograničavajući translokaciju transkripcijskog faktora NF $\kappa$ B, sprječava njegovo vezanje za DNK i unutarstaničnu signalizaciju koja potiče upalni odgovor organizma (6).

Potencijalni terapijski učinci melatonina na parodontnu bolest su zabilježeni u in vitro studijama, studijama na životinjskim modelima te u kliničkim istraživanjima (10).

U studiji koju su proveli Almughrabi i suradnici (9) dokazana je obrnuto proporcionalna povezanost između stupnja parodontne bolesti i razine melatonina u slini i sulkularnoj tekućini mjerenih u četiri skupine ispitanika; skupini zdravih pojedinaca, onih s gingivitisom, kroničnim te agresivnim parodontitisom. Razina melatonina bila je najniža u osoba s agresivnim parodontitisom, dok je značajna statistička razlika pronađena između zdravih osoba i obje skupine s parodontitisom. Ove rezultate potvrdilo je i nadopunilo istraživanje u kojem su utvrđene značajno niže razine melatonina u uzorku gingive osoba s kroničnim parodontitisom u usporedbi sa zdravim pojedincima (28). Ovakvi rezultati mogu se pojasniti činjenicom da su

snižene razine melatonina posljedica njegove antioksidativne aktivnosti protiv slobodnih radikala koji nastaju tijekom kronične upale parodonta. Osim toga, navedenu pretpostavku može potvrditi i informacija da je zabilježeno povećanje salivarnog melatonina nakon provedene inicijalne, nekirurške parodontne terapije, ali bez popratnih promjena u serumskoj koncentraciji melatonina, što govori u prilog lokalnom, antioksidativnom učinku melatonina u usnoj šupljini (6).

Ipak, odnos između parodontnog statusa i koncentracije melatonina u slini i dalje nije do kraja razjašnjen. Jedno istraživanje, ono Cutanda i suradnika je u osoba s dijabetesom i parodontitisom dokazalo povišene razine melatonina u slini i serumu, što su autori objasnili imunomodulirajućim učinkom melatonina (27). U preostalim studijama sveza salivarnog melatonina i parodontnog statusa bila je negativna (10).

Kara i suradnici su u svom istraživanju na životinjskim modelima dokazali protuupalno i antioksidativno djelovanje egzogeno primijenjenog melatonina (29). Inducirali su parodontitis na mandibularnim molarima štakora, te su jednoj od skupina davali placebo, a drugoj intraperitonealno melatonin kroz 15 dana. Zabilježili su snižene serumske razine proupalnih citokina IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i 8-OHdG (proizvod oksidativnog oštećenja DNK) u uzorku tkiva skupine koja je primila melatonin. Melatonin je u uzorku tkiva potaknuo proizvodnju GSH, važnog unutarstaničnog antioksidansa te je smanjena mobilizacija neutrofila i monocita, odnosno makrofaga u gingivalno tkivo. Također su pokazali manji gubitak kliničkog pričvrstka u odnosu na neliječenu skupinu.

Melatonin ima ulogu i u očuvanju kosti u parodontnoj bolesti. Djeluje kao antioksidans, na razini osteoklastičnih lakuna neutralizira slobodne radikale i time sprječava aktivaciju osteoklasta i resorpciju kosti (23). Dodatno inhibira ekspresiju liganda receptora aktivatora NF $\kappa$ B, (RANKL), te posljedičnu diferencijaciju i proliferaciju osteoklasta (23).

Osim inhibicije resorpcije kosti, melatonin ima i povoljan učinak i na stvaranje nove kosti. Dokazan je njegov stimulativni učinak na ljudske osteoblaste i sintezu kolagena tipa 1 te drugih proteina i markera koštanog tkiva, kao što su osteoprotegerin (OPG), osteopontin (OPN), osteokalcin (OCN) i alkalna fosfataza (AP). Melatonin je u istraživanjima uspio potaknuti ubranu diferencijaciju preosteoblasta u osteoblaste sa uobičajenih 21 na 12 dana (21).

Parodontna bolest povezana je sa povišenom razinom alkalne i kisele fosfataze u slini te, zbog destrukcije kosti, sniženih razina proteina koštanog matriksa osteopontina i osteokalcina (30). Cutando i suradnici u svojoj studiji ispitivali su učinak melatonina na prethodne parametre (30).

Dokazali su značajno više razine alkalne i kisele fosfataze u pacijenata s dijabetesom i parodontitisom, te niske razine OPN-a i OCN-a u usporedbi s kontrolnom skupinom. Nakon primjene 1% melatonina u obliku orabaze na gingivu kroz 20 dana, zabilježeno je statistički značajno sniženje koncentracije fosfataza te povišenje OPN i OCN u slini, uz bitno poboljšanje kliničkih parametara – gingivalnog indeksa i dubine sondiranja. U sličnom istraživanju su isti autori ispitali salivarnu razinu RANKL i OPG-a te serumskog i salivarnog melatonina u osoba s dijabetesom i parodontitisom (31). Nakon početnih mjerenja, pacijenti su primjenjivali melatonin topikalno kroz 20 dana. U usporedbi sa kontrolnom skupinom, pacijenti s dijabetesom su inicijalno imali povišene razine RANKL-a u slini, uz niske razine OPG-a te niske koncentracije melatonina i u serumu i u slini. Nakon terapije melatoninom zabilježen je porast salivarnog i serumskog melatonina i osteoprotegerina te redukcija salivarnog RANKL-a, gingivalnog indeksa i dubine sondiranja (31).

Rezultati ovih istraživanja govore u prilog povoljnom učinku melatonina na koštano zdravlje inhibicijom osteoklastične aktivnosti. Osim toga brojna prethodno opisana istraživanja pokazala su regulatorni učinak melatonina na upalni odgovor organizma u tijeku parodontne bolesti, što sugerira mogućnost primjene melatonina u sklopu parodontne terapije.

### **3.2. Oralni karcinom**

#### **3.2.1. Karcinogeneza i melatonin**

Oralni karcinom, odnosno oralni planocelularni karcinom (PCC), 8. je karcinom po učestalosti u svijetu i čini otprilike polovicu karcinoma glave i vrata (11). Godišnje se dijagnosticira preko 300 000 slučajeva PCC-a u svijetu (11). Najčešće se javlja u srednjoj i starijoj životnoj dobi, s prosječnom dobi od 60 godina. Zbog odsutnosti simptoma u ranijim fazama, PCC se najčešće dijagnosticira u uznapredovalom stadiju, kada uzrokuje bol, otežano gutanje i žvakanje, otvaranje usta ili oteklinu na vratu (32). Nastanak oralnog karcinoma nije u potpunosti razjašnjen, ali kao i s ostalim karcinomima predstavlja složeni proces; započinje progresivnom akumulacijom genetskih oštećenja, koji dovode do poremećaja u ravnoteži onkogeni i tumorsupresorskih gena, što je potaknuto genetskom predispozicijom i okolišnim čimbenicima, kao što su konzumacija alkohola i duhanskih proizvoda, žvakanje betelova oraha i virusne infekcije (33,34).

Melatonin je već iscrpno istraživan u patogenezi brojnih karcinoma; pronađena je poveznica manjka sna i karcinoma glave i vrata, dojke, prostate i drugih zloćudnih bolesti, a veći broj

maligniteta zabilježen je u osoba koje rade noćne smjene (8,35). S obzirom na dosad dokazana svojstva melatonina, mogući su učinci melatonina na različitim razinama karcinogeneze.

U kontekstu prevencije inicijacije karcinogeneze, jedan od mogućih mehanizama je neutralizacija slobodnih radikala koji oštećuju DNK; kumulacijom genetskih oštećenja može doći do neravnoteže onkogeni i protoonkogeni te posljedično inicijacije karcinogeneze (36). Pored toga slobodni radikali mogu uzrokovati alteracije u staničnoj signalizaciji i time pridonijeti daljnjem širenju i nastanku metastaza (36). Brojna su istraživanja dokazala da je metilacija DNK bitan uzrok inaktivacije brojnih tumor-supresorskih gena u karcinomima u čovjeka, uključujući PCC (33). CDKN2, CDH1, MGMT te p16 samo su neki od tumor-supresorskih gena utišanih metilacijom DNK (11,33). Nakamura i sur. (33) su genskom hibridizacijom kulture stanica PCC-a zabilježili smanjenu ekspresiju gena za melatoninski receptor 1 A (MTNR1A), dok je u zdravoj oralnoj sluznici bio normalno eksprimiran. Isto tako, zabilježen je nedostatak imunoreaktivnosti MTNR1A u primarnim PCC-ima, kao i hipermetilacija lokusa 4q35 na kojem se nalazi navedeni gen. Analizom je uočena statistički značajna povezanost ekspresije MTNR1A gena sa T kategorijom TNM klasifikacije; točnije T3 i T4 stadiji PCC nisu imali eksprimiran spomenuti gen. Dodatno, dokazana je i proporcionalna povezanost ekspresije MTNR1A u PCC i stope preživljenja; niže stope preživljenja zabilježene su u skupini bez ekspresije MTNR1A. Slične rezultate dobili su i u istraživanju poveznice između genetskog polimorfizma MTNR1A i rizika nastanka PCC te kliničko-patološkog tijeka bolesti. Ustvrdili su da genetski polimorfizam nema samostalnu implikaciju u oralnoj karcinogenezi; međutim u kombinaciji sa okolišnim čimbenicima, točnije žvakanjem betel oraha i/ili pušenjem dokazan je značajno veći rizik od nastanka oralnog karcinoma, uz povezanost sa uznapredovalim kliničkim stadijem i metastazama u limfne čvorove (34).

Otkriće Nakamure i sur. sugerira da je MTNR1A gen epigenetski utišan te da ima potencijalnu ulogu u oralnoj karcinogenezi. Potonje su ispitali egzogenom restauracijom receptora MTNR1A te njegovom transfekcijom stanica PCC-a; dokazali su supresiju rasta stanica, odnosno antiproliferativni učinak na kultivirane stanice PCC (33).

U zadnje vrijeme postoji velik broj istraživanja koji su dokazali onkostatski učinak melatonina in vitro te in vivo u različitim malignim bolestima, kao što su karcinom dojke, prostate, melanom i gliom, a među njima i PCC (33). Pronađen je proapoptičan učinak melatonina na stanice tumora povećanjem ekspresije p21 i p27 tumor-supresorskih gena, kao i smanjena proliferacija ELT-3 stanica, inhibicijom aktivacije transkripcijskog čimbenika NF- $\kappa$ B, koji potiče sintezu velikog broja proupalnih medijatora i time pogoduje mikrookolišu tumora (4,37).

Nadalje, dokazan je antimetastatski učinak melatonina u PCC (38). Antimetastatski učinak objašnjava se inhibicijom unutarstanične signalizacije neutrofila povezanih s tumorom (TAN, *engl. tumor-associated neutrophils*), koji luče razne proupalne kemokine, ali i kolagenaze kao što je matriks metaloproteinaza 9; oni potiču migraciju tumorskih stanica, odnosno razgrađuju ekstracelularni matriks koji im omogućuje invaziju u druga tkiva. Također dokazan je veći broj tih stanica u naprednijim stadijima PCC; značajno više ih je pronađeno u T4 stadiju, te u osoba s nodalnim metastazama u odnosu na osobe s PCC i N0 (38). Dokazan je i antiangiogeni učinak melatonina, smanjenjem ekspresije VEGF (*engl. Vascular Endothelial Growth Factor*) i hipoksijom inducibilnog faktora 1 alfa (HIF1 $\alpha$ ) na neutrofilima povezanih s tumorom (38).

Melatonin inhibira i rast već formiranih tumora; u stanicama hepatoma inhibira iskorištavanje masnih kiselina, osobito linoleične kiseline (LA – *engl. linoleic acid*). Na taj način sprječava nastanak metabolita linoleične kiseline, 13-HODE (*engl. 13-hydroxioctadecadienoic acid*), koja služi kao mitogen epidermalnog čimbenika rasta (EGF) (39).

Dokazan je još jedan način kojim melatonin modificira rast tumora, a to je inhibicijom telomerazne aktivnosti (40). Telomeraza je enzim koji nadodaje sekvence nukleotida na telomere na krajevima kromosoma; svakim ciklusom stanične diobe telomere se skraćuju i stanica se nakon određenog broja dioba prestane dijeliti kao posljedica inaktivacije telomeraze. Na taj način čuva se stabilnost genoma i sprječava akumulacija genskih oštećenja. U većini tumora telomeraza je aktivna i omogućuje nekontroliranu diobu stanica (36). Leon i sur. (40) dokazali su smanjenu aktivnost telomeraze u MCF-7 staničnoj liniji (stanična linija karcinoma dojke), te smanjenu ekspresiju mRNA obiju podjedinica telomeraze. Inhibicija telomeraze označava ograničeni broj staničnih dioba i posljedično smrt tumorskih stanica.

Obitelj proteina uključena u progresiju tumora su endotelini, osobito endotelin 1 (ET-1); visoke razine ET-1 pronađene su u osoba sa solidnim tumorima. ET-1 potiče proliferaciju tumorskih stanica, angiogenezu, metastatsko širenje i sprječava apoptozu (4). Pronađeno je da melatonin inhibira ET-1 konvertirajući enzim, protein koji sintetizira ET-1, ali i da smanjuje ekspresiju gena za ET-1 in vitro u stanicama kolorektalnog karcinoma (4,41).

Melatonin posjeduje nekoliko mehanizama kojim bi mogao postići onkostatski učinak; uključujući antioksidativno, antiproliferativno, antiangiogeno te imunostimulativno djelovanje (4).

Osim uloge melatonina u karcinogenezi, provedena su istraživanja njegovog učinka u terapiji zloćudnih bolesti. Lissoni i suradnici proveli su istraživanje konkomitantne primjene

melatonina tijekom kemoterapije metastatskih solidnih tumora, uključujući karcinom glave i vrata (42). Zabilježili su značajnu razliku u stopi 1-godišnjeg preživljenja te objektivnu regresiju tumora u skupini koja je uz kemoterapiju primala 20 mg melatonina dnevno prije, tijekom i nakon kemoterapije. Osim toga, toksičnost samih kemoterapeutika bila je smanjena u MLT skupini. Konkomitantna primjena melatonina smanjila je učestalost mijelosupresije, trombocitopenije, neurotoksičnosti, kardiotoksičnosti, stomatitisa i opće slabosti (astenije). Smanjena toksičnost lijekova, koja je dijelom posljedica slobodnih radikala, može se objasniti antioksidativnim učinkom melatonina. Veća stopa preživljenja u MLT skupini može biti rezultat smanjene imunosupresije kemoterapijom. Također, dokazani trombo-poetski učinak melatonina može objasniti niže stope trombocitopenije (42). Navedeni rezultati dobiveni su u ispitanika sa uznapredovalom metastatskom bolešću i lošeg općeg statusa; koji vrlo vjerojatno imaju snižene razine endogenog melatonina. Budući da serumske razine MLT nisu mjerene prije početka terapije, ne može se sa sigurnošću odrediti jesu li rezultati istraživanja samo posljedica nadoknade niskih razina melatonina.

Pretpostavljalo se da bi mjerenje razine melatonina u plazmi moglo poslužiti i u dijagnostičke svrhe, što bi bilo od osobite koristi u ranim fazama karcinoma. Međutim, rezultati su dvosmisleni; snižene razine melatonina izmjerene su u pacijenata s karcinomom dojke, prostate i pluća, što se objasnilo smanjenom kvalitetom sna i povećanim umorom onkoloških bolesnika (8). Druga su pak mjerenja u osoba s kolorektalnim karcinomom, melanomom i multiplim mijelomom pokazala povišene serumske razine melatonina, pripisujući to reaktivnom lučenju u svrhu ostvarenja protektivnog, antioksidativnog i imunostimulirajućeg učinka melatonina (8). Kada je riječ o razini serumskog melatonina u oralnom karcinomu, Stanciu i suradnici utvrdili su značajno niže razine melatonina u plazmi osoba sa oralnim karcinomom u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (43). Osim toga, njihovi rezultati pokazali su značajnu razliku između pacijenata sa nodalnim metastazama i onima bez metastaza. Na temelju rezultata pretpostavili su negativnu korelaciju između serumske razine melatonina i stadija PCC. S obzirom na prethodne rezultate, i činjenicu da je melatonin prisutan i u slini koja je lako dostupna za uzorkovanje, može se očekivati da razina salivarnog melatonina reflektira onu serumskog. Međutim, Salarić i suradnici (8) su u svom istraživanju dokazali znatno povišene razine salivarnog melatonina u odnosu na zdravu kontrolu; dok je izmjereni serumski melatonin bio unutar normalnih vrijednosti u pacijenata s T1N0M0 PCC. Budući da su Nakamura i suradnici otkrili nedostatak ekspresije gena za MTNR1A in vitro, može se pretpostaviti da je povišena razina melatonina u slini posljedica smanjenog broja receptora na tumorskim stanicama (33); no

za to su potrebne opsežnije studije. Isto tako, prema navodima prethodno navedenih istraživanja, postoji mogućnost reaktivnog povećanja melatonina u svrhu zaštitnog učinka u PCC; a s obzirom na normalne vrijednosti serumskog melatonina, postoji i mogućnost lokalne sinteze melatonina. No, za točan mehanizam učinka melatonina u PCC, potrebna su nova saznanja o karcinogenezi PCC i daljnja istraživanja melatonina koja će uključiti sve prethodne parametre – mjerenja serumskog i salivarnog melatonina u ranim i kasnim stadijima PCC, prije i poslije njegove terapijske primjene, prisutnost ili odsutnost MTNR1A receptora na tumorskim stanicama te ukupni antioksidativni kapacitet sline.

### 3.2.2. Mukozitis i melatonin

Oralni mukozitis jedna je od najčešćih nuspojava kemo- i radioterapije glave i vrata; u tijeku kemoterapije 40-80% pacijenata razvije oralni mukozitis, dok pacijenti na radioterapiji glave i vrata razviju oralni mukozitis u 80-90% slučajeva (44,45). Oralni mukozitis uzrokovan zračenjem nastaje u nekoliko koraka. Zračenje dovodi do oštećenja DNK, proizvodnje slobodnih radikala i nastanka oksidativnog stresa. Slobodni radikali zatim aktiviraju transkripcijski čimbenik NF- $\kappa$ B, koji dovodi do proizvodnje proupalnih medijatora poput IL-6, TNF- $\alpha$  i posljedično apoptoze stanica i oštećenja oralne sluznice (44,45). Rezultat tih procesa očituje se u vidu oralnih ulceracija, koje mogu uzrokovati izrazitu bol, otežano gutanje i govor, nemogućnost uzimanja hrane te u konačnici dovesti do prekida radioterapije i smanjenog terapijskog učinka (45). Dosad su ispitivani različiti terapijski modaliteti u terapiji oralnog mukozitisa, većinom usmjereni na ublažavanje simptoma, ali s relativnim uspjehom (45). S obzirom na ulogu slobodnih radikala u patogenezi oralnog mukozitisa, antioksidansi, među kojima je i melatonin, predlagani su u njegovoj terapiji (44). Elsabagh i sur. ispitali su razlike u težini oralnog mukozitisa između osoba na radioterapiji koje su uzimale suportivnu terapiju sastavljenu od topikalnih analgetika, anestetika i protuupalnog sredstva i eksperimentalne skupine koja je uzimala 20 mg melatonina dnevno (44). Oralni mukozitis stupnjevan je prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji u 4 stupnja, s obzirom na prisutnost simptoma, lezija i funkcioniranje pacijenta (44). Stupanj I označava prisutnost eritema, stupanj II predstavlja pojavu boli, ulceracija i eritema te normalno uzimanje hrane; stupanj III podrazumijeva konfluirajuće ulceracije i nemogućnost uzimanja krute hrane; te stupanj IV u kojem je pacijentu potrebna parenteralna prehrana. U istraživanju su zabilježili pogoršanje stanja u kontrolnoj skupini (stupanj 3 i 4) prema kraju terapije, dok je 90% testne skupine tijekom radioterapije ostalo na blažem obliku mukozitisa. Također su zabilježene niže vrijednosti boli u melatoninskoj skupini.

### 3.3. Melatonin i dentalni implantati

Dentalni implantati danas su popularan i sve više primjenjivan način nadomještanja jednog ili više zubi. Cilj je implantoterapije osigurati dugoročni uspjeh i očuvanje implantata u usnoj šupljini, što se može postići adekvatnom oseointegracijom. Oseointegracija implantata podrazumijeva odlaganje nove kosti na površinu implantata kao i remodelaciju postojeće kosti. Stvaranje nove kosti obuhvaća kaskadu reakcija: upalni odgovor, sazrijevanje i apoziciju stanica i proteina, vaskularnu invaziju, odlaganje koštanog matriksa i mineralizaciju. Ovi procesi mogu se ubrzati lokalnom primjenom različitih faktora rasta, a čini se da je to slučaj i sa primjenom melatonina (10).

Primjena melatonina u svrhu poticanja stvaranja nove kosti nakon ugradnje implantata procjenjivana je u različitim istraživanjima, temeljenima na različitim životinjskim modelima, gdje su autori promatrali učinak samostalno primijenjenog melatonina ili melatonina u kombinaciji sa nekim od poznatih faktora rasta kao što su to hormon rasta (GH – *engl. growth hormone*) ili fibroblastični faktor rasta 2 (FGF-2 – *engl. fibroblastic growth factor 2*) (46–50). Svi uzorci kosti promatrani su histološki i histomorfometrijski. Histomorfometrijski parametri koji su korišteni u procjeni uspješnosti oseointegracije implantata u različitim studijama bili su: BIC – *engl. bone to implant contact* ( definirana je kao dužina kosti koja je u kontaktu s implantatom cijelim njegovim promjerom, odnosno postotak implantata koji je u kontaktu s kosti), gustoća kosti (BV/TV – *engl. bone volume/tissue volume*- označava udio kosti u ukupnom volumenu tkiva), novoformirana kost (*engl. newly formed bone - NFB*) te kost koja se nalazi između navoja implantata ( *engl. inter-thread bone – ITB*). Pojedine studije su na histološkim preparatima zabilježile pojavu novostvorenog koštanog tkiva, mineralizaciju, koštanu srž te različite stanice koje sudjeluju u osteogenezi (24,46–51). Količina primijenjenog melatonina kretala se od 1,2 do 5 mg liofiliziranog melatonina u prahu te 100 mg/kg intraperitonealno primijenjenog melatonina (24,46–51). Sažetak svih istraživanja na različitim životinjskim modelima i njihovih rezultata prikazan je u tablici 1.

Većina istraživanja ispitivala je učinke nakon kratkog vremena od postavljanja implantata, najčešće između 2. i 8. tjedna. U tom periodu zabilježeni su statistički značajno povećanje BIC, gustoća kosti, kost između navoja i novoformirana kost, te na histološkim preparatima povećana proliferacija osteoblasta u periimplantatnoj zoni (24,50). Zanimljivo je da su u kasnijim tjednima parametri između eksperimentalne i kontrolne skupine bili slični, bez statistički



značajne razlike (47,50). Brojni autori na temelju ovih rezultata zaključuju kako je uloga melatonina osobito ključna u ranim fazama cijeljenja (50).

Prvi su Cutando i suradnici na psima ispitivali samostalnu primjenu melatonina u alveolu neposredno prije ugradnje dentalnih implantata te su nakon 2 tjedna zabilježili statistički značajno povišenje svih parametara oseointegracije (24). Takechi i suradnici prijavili su značajan porast koštane sinteze na histološkim preparatima te BIC-a i gustoće kosti u skupini životinja tretiranoj kombinacijom melatonina i FGF-2, znatno viši nego u skupinama sa zasebno primijenjenim MLT i FGF-2 (46). U istraživanju provedenom od strane Muñoza i suradnika ispitivana je primjena melatonina u kombinaciji sa hormonom rasta na psima, te je dokazano statistički značajno povećanje BIC-a, gustoće kosti te kosti među navojima implantata nakon 2 tjedna; međutim u mjerenju nakon 5 i 8 tjedana nije bilo razlike u BIC i gustoći kosti u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je nakon 8 tjedana zabilježena statistički značajna razlika u postotku novostvorene kosti u eksperimentalnoj skupini (47). Prethodno navedeni rezultati podupiru tezu da melatonin ima bitnu ulogu u ranijim fazama koštanog cijeljenja.

Osim tih, provedeno je i istraživanje učinka melatonina pri ugradnji imedijatnih implantata u pseću mandibulu (49), gdje su nakon 12 tjedana izmjereni značajno viši ukupni BIC i kost između navoja implantata u odnosu na kontrolnu skupinu. Ti rezultati podudaraju se i sa istraživanjem Tresguerres i suradnika pri ugradnji implantata u goljениčnu kost zečeva, gdje je izmjereno povećanje trabekularnog BIC i gustoće trabekularne kosti, te histološki vidljivi novi preosteoblasti i više remodelirana kortikalna kost nego u kontrolnoj skupini (48).

S obzirom da su učinci melatonina u kasnijim fazama cijeljenja manje izraženi, te s obzirom na njegovo vrijeme poluživota od 23 minute, postoji ideja o primjeni melatonina sa nosačem melatonina koji bi omogućio njegov dugoročniji učinak (47,52).

Calvo- Guirado i suradnici su u svom istraživanju na modelima zečeva ispitivali razlike u oseointegraciji između cirkonijevih i titanijevih implantata (51). Ugrađeno je ukupno 80 implantata, po 4 implantata u goljениčne kosti svake životinje. Korištene su 4 različite vrste implantata – titanski i cirkonij implantati obrađeni konvencionalno pjeskarenjem te jetkanjem; zatim cirkonij implantati s laserski dobivenim mikrourezima tretirani melatoninom, te implantati od titana čija je površina premazana melatoninom prije ugradnje. Nakon 1. tjedna zabilježene su statistički značajne razlike u BIC u zadnje dvije skupine u odnosu na one kontrolne, te nakon 4 tjedna, gdje su značajnu statističku razliku imali tretirani cirkonij

implantati, što se pojašnjava načinom proizvodnje i nastankom mikroureza koji služe kao nosač melatoninu i omogućuju njegovo postepeno otpuštanje.

Tablica 1: Sažetak svih istraživanja o primjeni melatonina pri ugradnji dentalnih implantata

AUTORI	ŽIVOTINJSKI MODEL	BROJ ŽIVOTINJA/ IMPLANTATA	VRIJEME OD UGRADNJE IMPLANTATA	PRIMJENA MELATONINA	REZULTATI
Cutando i sur., 2008.	Bigl pas ( <i>engl.beagle</i> )	12/72	2 tjedna	Samostalna (1,2 mg MLT)	↑ BIC, BV/TV, NFB, ITB u MLT skupini
Takechi i sur., 2008.	Wistar štakor	10/20	4 tjedna	100 mg/kg MLT +FGF-2	↑ BIC, BV/TV u MLT+FGF-2 skupini
Guardia i sur., 2011.	Bigl pas ( <i>engl.beagle</i> )	12/72	5 i 8 tjedana	Samostalna (1,2 mg MLT)	Više novostvorene kosti u MLT skupini
Muñoz i sur., 2012.	Bigl pas ( <i>engl.beagle</i> )	12/48	2,5 i 8 tjedana	1,2 mg MLT + Hormon rasta	↑ BIC, BV/TV, ITB nakon 2. tjedna te NFB nakon 8. tjedna u MLT+HR skupini
Tresguerres i sur., 2012.	Novozelandski zec	10/40	4 tjedna	Samostalna (3 mg MLT)	↑ BIC, BV/TV u MLT skupini
Salomó-Coll i sur., 2012.	Engleski lisičar ( <i>engl. foxhound</i> )	6/24	12 tjedana	Samostalna (5% MLT)	↑ BIC u MLT skupini
Calvo-Guirado i sur., 2015.	Novozelandski zec	20/80	1 i 4 tjedna	Samostalna (5% MLT)	↑ BIC kod Ti i Zr implantata nakon 1. tjedna, nakon 4. tjedna kod Zr implantata

Nakon ugradnje implantata, često dolazi do nekroze kosti i upale kao direktne posljedice kirurškog zahvata i preparacije kosti. Tijekom i nakon zahvata, upalne stanice makrofazi i PMN leukociti migriraju na mjesto ugradnje i potiču stvaranje slobodnih radikala. Melatonin svojim protuupalnim i antioksidativnim sposobnostima može neutralizirati posljedice navedene uobičajene postoperativne pojave (10).

U prethodno navedenim studijama melatonin je, u farmakološkim dozama, pospješio oseointegraciju implantata, sa značajnim povećanjem BIC-a i postotkom kosti između navoja implantata, što se tumači stimulatornim učinkom na osteoprogenitorne stanice- potiče i ubrzava diferencijaciju osteoblasta, a time i ubrzava proizvodnju i mineralizaciju osteoidnog matriksa (20,21). Osim toga, povećava ekspresiju i proizvodnju proteina koštanog matriksa, poput kolagena i glikoproteina (20–22).

Veća površina kosti u kontaktu s implantatima može se objasniti i inhibitornim učinkom melatonina na resorpciju kosti, povećanjem OPG-a i antioksidativnim djelovanjem na razini

osteoklastičnih lakuna, neutralizirajući slobodne radikale koji razgrađuju proteine matriksa (50).

### **3.4. Melatonin i cijeljenje postekstrakcijske rane**

Nakon ekstrakcije zuba, bakterije usne šupljine koloniziraju površinu krvnog ugruška, granulacijsko tkivo, epitel rane i okolnu gingivu. Shodno tome, ekstrakcijsku ranu u prvih 24-48 sati prati edem i vazodilatacija, odnosno upalni odgovor i snažna infiltracija polimorfonuklearnih leukocita i monocita, čija uloga je fagocitoza bakterija; međutim prilikom toga proizvode slobodne radikale (53). Osim upalnog odgovora, pri vađenju zuba dolazi do trganja vlakana gingive, oštećenja krvnih žila parodonta i mehaničke ozljede oralnih tkiva. Zajedno, ti procesi dovode do povećanja razine slobodnih radikala i oksidativnog stresa, koji dovode do smanjenog *turnovera* epitelnih stanica i oštećenja DNK (53). Slobodni radikali potiču proizvodnju raznih proupalnih čimbenika, potenciraju upalu, i time ugrožavaju cijeljenje postekstrakcijske rane (53). Cutando i suradnici pokazali su da je lokalno primijenjen melatonin u postekstrakcijsku alveolu pasa bitno smanjio razinu svih parametara oksidativnog stresa u plazmi u odnosu na kontrolnu skupinu; izmjerene su znatno niže razine proizvoda lipidne peroksidacije, smanjena razina NO te povećanje razine GSH (54). Navedeni rezultati pripisuju se antioksidativnom učinku melatonina. Dodatno, Soybir i suradnici zabilježili su značajno veći broj novoformiranih krvnih žila i fibroblasta tijekom cijeljenja rane u skupini s primijenjenim melatoninom (55).

Melatonin bi stoga, smanjujući oksidativni stres i oštećenje tkiva te potičući stvaranje novih krvnih žila i vezivnog tkiva, mogao pridonijeti cijeljenju postekstrakcijske rane.

### **3.5. Rekurentni aftozni stomatitis**

Rekurentni aftozni stomatitis (RAS) predstavlja poremećaj oralne sluznice karakteriziran rekurentnim ulceracijama bez ijednog drugog kliničkog znaka. Smatra se da je riječ o posljedici citotoksičnog djelovanja defektnih CD4 i CD8 limfocita prema oralnom epitelu (56). Međutim, novija istraživanja govore o poremećenoj funkciji citokina sluznice. Smatra se da postoji abnormalna kaskada mukoznih citokina što dovodi do pretjeranog imunskog odgovora, te posljedično lokalizirane ulceracije sluznice (56). Osim toga i ROS su implicirani u etiopatogenezi RAS-a (2,3). Melatonin kao antioksidans i protuupalni čimbenik je na životinjskim modelima ubrzao cijeljenje kroničnih gastričnih ulkusa induciranih proizvodnjom

NO i PG-E2 (3). Također, peroralno primijenjen melatonin uspješno je prevenirao nastanak akutnih ezofagealnih lezija (3). S obzirom na saznanja o etiopatogenezi RAS te učincima melatonina na razini inhibicije sinteze NO i COX-2, moguća je terapijska primjena melatonina i u oralnim ulceracijama, no potrebna su daljnja ciljana istraživanja primjene melatonina u RAS.

### **3.6. Virusne infekcije usne šupljine**

Pozitivni učinci melatonina kao antivirusnog agensa zabilježeni su u različitim sistemnim virusnim infekcijama. Kada je riječ o virusnim infekcijama usne šupljine, istraživani su učinci melatonina u liječenju oralnih herpes simpleks infekcija. Dokazana je podjednaka učinkovitost primjene melatonina u usporedbi s antivirusnim lijekom aciklovirom (10). Herpes infekcije često nastaju pri oslabljenom imunom sustavu, stresu ili izlaganjem UV zračenju (6). Učinak melatonina može se pojasniti stimulacijom i stečene i prirodne imunosti; dokazano je da melatonin inducira proizvodnju interleukina-1-beta koji ima antivirusna svojstva; također melatonin je sposoban potaknuti staničnu imunost i aktivnost NK stanica (6,12,15). Svojim antioksidativnim djelovanjem može ojačati imunost sustav oslabljen oksidativnim stresom (10).

### **3.7. Kandidijaza**

Učinak melatonina u kandidijalnim infekcijama istraživani su na različitim modelima; dokazano je snizio lučenje IL-6, TNF- $\alpha$  i adhezijskih molekula u štakora sa kandidijalnom sepsom (57). Dodatno, dokazano je povećanje fagocitnog indeksa (broja fagocitirane *C.albicans*) te kandidnog učinka heterofila na modelu grlica (58). Kao posljedica fagocitnog učinka, očekivan je porast ROS koji generiraju upalne stanice; međutim zabilježen je pad razine superoksidnog aniona primjenom melatonina (58). Navedeni rezultati mogu potvrditi imunostimulirajući i antioksidativni učinak melatonina (2). Primjena melatonina u oralnoj kandidijazi ipak zahtijeva dodatna istraživanja.

### **3.8. Karijes**

Zubni karijes je bakterijama induciran, kroničan i dinamičan proces koji nastaje kao posljedica neravnoteže između minerala zubnog tkiva i pH usne šupljine, što rezultira demineralizacijskim procesom i gubitkom tvrdih zubnih tkiva. Njegova je etiologija multifaktorijalna. Nedavno je naglasak stavljen na ulogu oksidativnog stresa u nastanku i progresiji karijesa, a uslijedila su i

istraživanja koja su pokazala da je u osoba s aktivnim karijesnim lezijama snižena razina melatonina u slini, a povišena razina malondialdehida, proizvoda lipidne peroksidacije i markera oksidativnog stresa (59). Slobodni radikali dovode do proizvodnje upalnih medijatora koji posljedično aktiviraju matriks metaloproteinaze koje destruiraju kolagen, a time i dentinski matriks. Jedno objašnjenje ovih rezultata je da karijesni proces povećava oksidativni stres, a razine melatonina smanjuju se u toku njegova djelovanja (59). Isto tako, zabilježena je veća incidencija karijesa u hrčaka u proljeće i ljeto, kada je više dnevnog svjetla i smanjeno lučenje melatonina, što ukazuje na zaštitni učinak melatonina i u karijesu. Nadalje, poznato je koliko je bitan učinak prehrane u nastanku karijesa; voće, povrće i orašasti plodovi sadrže melatonin u određenim količinama pa njihovom redovnom konzumacijom osobe s visokim karijes rizikom mogu pridonijeti zaštitnom učinku melatonina (2).

### **3.9. Melatonin i kserostomija**

Budući da je u starijih osoba i nekih autoimunih bolesti smanjena aktivnost žlijezda slinovnica, posljedica smanjenog salivarnog protoka je izostanak protektivnog učinka sline te povećani rizik od karijesa, parodontitisa i kandidijaze. Smanjeni salivarni protok značio bi i nisku razinu melatonina (6). Dokazano je da egzogeno primijenjen melatonin potiče sekreciju amilaze i proteina iz parotidne žlijezde štakora. Sekretorni proteini sline bitni su u zaštiti usne šupljine. Učinak melatonina dijelom je ostvaren preko melatoninskih receptora acinarnih stanica, a dijelom djelovanjem neuronske NO sintetaze (60,61). Može se razmišljati i o terapijskoj primjeni melatonina u starijih osoba i osoba s kserostomijom, u kojih se pokaže snižena razina salivarnog melatonina.



Temeljem brojnih istraživanja na ljudima i raznim životinjskim modelima, može se uočiti potencijalna korist primjene melatonina kao pomoćne terapije bolesti usne šupljine, te kao lokalnog čimbenika pri dentalnim zahvatima.

Višestruki učinci melatonina u bolestima usne šupljine mogu se pojednostavljeno objasniti njegovim antioksidativnim, protuupalnim i imunomodulirajućim učincima te povoljnom utjecaju na koštani metabolizam.

Parodontna bolest nastaje kao rezultat učinka bakterija i njihovih toksina te posljedičnog snažnog imunosnog odgovora domaćina, a u patogenezu su uključeni i slobodni radikali koji potenciraju upalu i resorpciju kosti. Primjena melatonina samostalno ili u sklopu parodontne terapije čini se opravdana. Topikalna aplikacija melatonina na gingivu značajno je poboljšala kliničke parametre bolesti, ali i smanjila akumulaciju imunosnih stanica u tkivu parodonta, a time i upalu (29–31). Aktivnost parodontne bolesti, odnosno koštano zdravlje u parodontitisu može se pratiti mjerenjem salivarnih parametara koštanog metabolizma. RANKL, alkalna i kisela fosfataza, OPN i OCN bili su znatno povišeni u aktivnoj fazi parodontitisa, odnosno resorpciji kosti, dok je OPG bio snižen. Primjena melatonina rezultirala je smanjenjem dubine sondiranja, ali i snižavanjem RANKL-a, OPN, OCN, alkalne i kisele fosfataze te povišenjem OPG u slini (30,31). Čini se da, što je teži oblik parodontitisa, to je razina melatonina niža; što se može objasniti njegovim protektivnim djelovanjem u toku bolesti (9). Melatonin bi mogao poslužiti i kao biomarker težine parodontitisa, međutim za tu tvrdnju potrebna je dodatna potvrda. Zaštitna uloga melatonina može se dijelom objasniti njegovim antimikrobnim učincima na parodontopatogene bakterije, aktivacijom obrambenog sustava, protuupalnim djelovanjem te neutralizacijom slobodnih radikala. Inhibicijom resorpcije kosti i poticanjem stvaranja nove, sprječava i najtežu posljedicu parodontne bolesti, a to je gubitak zuba. S obzirom na utjecaj parodontne bolesti na udaljene organe, kao što su pluća, jetra i bubrezi, zbog ulaska LPS u krvotok; ograničavanjem parodontne upale melatonin bi prevenirao oksidativna oštećenja i drugih organskih sustava (6).

Primjena melatonina u alveolu pri ugradnji implantata rezultirala je poboljšanim učinkom na ranu fazu oseintegracije u svim navedenim istraživanjima, povećanjem površine kosti u kontaktu sa implantatom, gustoće periimplantatne kosti te povećanjem količine kosti između navoja implantata. Navedeni rezultati posljedica su direktnog učinka na osteoblaste, sa posljedično bržim odlaganjem i mineralizacijom koštanog matriksa. Čini se da melatonin ima pozitivan učinak tijekom rane faze cijeljenja jer su značajne razlike pronađene u prvih 2 do 5 tjedana od ugradnje; dok su manje vidljivi učinci nakon 8 tjedana (24,48,50). Uzevši u obzir

prethodno navedeno, kao i činjenicu da neutralizira slobodne radikale te djeluje kao endogeni inhibitor ciklooksigenaze, melatonin može smanjiti opseg upale koja nastaje poslije kirurškog zahvata (16,50). Sve zajedno može pridonijeti bržem i uspješnijem cijeljenju, skratiti vrijeme oseointegracije te time poboljšati kvalitetu života pacijenata.

Melatonin ima dokazana onkostatska svojstva – zahvaljujući svojem antiproliferativnom djelovanju, stimulaciji imunosti, kontroli ekspresije onkogeni; ali i antiangiogenom i antioksidativnom učinku. Njegov antitumorski učinak dokazan je u in vivo i in vitro istraživanjima (10). Neki od mogućih mehanizama su poticanje apoptoze, inhibicija telomerazne aktivnosti, smanjenje ekspresije čimbenika bitnih u angiogenezi, stimulacija NK stanica, sprječavanje proliferacije i ograničavanja dostupnosti pojedinih metabolita tumorskim stanicama (36,38–41).

Osim toga, melatonin može biti od koristi pacijentima s oralnim karcinomom, kao palijativna terapija - može olakšati podnošenje kemoterapije, smanjiti posljedičnu neuro- i kardiotoksičnost, opću slabost, spriječiti imunosupresiju i trombocitopeniju (42). Ako liječenje oralnog karcinoma zahtijeva radioterapiju, melatonin može smanjiti utjecaj ionizirajućeg zračenja i simptome oralnog mukozitisa te olakšati pacijentu da prebrodi liječenje bez prekidanja radioterapije (44,45).

Druge oralne bolesti nisu jednako dobro istražene kao prethodne; međutim i rezultati tih malobrojnih istraživanja učinka melatonina u RAS, herpes i kandidijalnoj infekciji te kserostomiji su obećavajući; s obzirom na već poznate povoljne zaštitne učinke melatonina.





Melatonin je ubikvitarna molekula s mnogobrojnim funkcijama u organizmu. S obzirom na najnovija saznanja o ulozi oksidativnog stresa i slobodnih radikala u nastanku brojnih bolesti usne šupljine, primjena melatonina kao snažnog antioksidansa i imunomodulatora od velikog je interesa u svim granama dentalne medicine.

Melatonin se može primjenjivati na razne načine, a danas je dostupan i bez recepta u obliku tableta ili spreja. Budući da se radi o prirodnoj tvari, nema značajnih nuspojava, netoksičan je te siguran za primjenu.

Sve navedeno ga čini potencijalnim terapijskim sredstvom oralnih bolesti; no za potpunu opravdanost terapijske primjene u usnoj šupljini potrebna su daljnja klinička istraživanja na većem broju uzorka, koja će točno definirati terapijsku dozu, adekvatan način i trajanje primjene melatonina u bolestima usne šupljine.

## **6. LITERATURA**

1. Oral health [Internet]. [Citirano 30. kolovoz 2022.]. Dostupno na: <https://www.who.int/health-topics/oral-health>
2. Gómez-Moreno G, Guardia J, Ferrera M, Cutando A, Reiter R. Melatonin in diseases of the oral cavity. *Oral Dis.* 2010;16:242–7.
3. Czesnikiewicz-Guzik M, Konturek SJ, Loster B, Wisniewska G, Majewski S. Melatonin and its role in oxidative stress related diseases of the oral cavity. *J Physiol Pharmacol.* 2007;58:5-19.
4. Sánchez A, Calpena A, Clares B. Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin. *Int J Mol Sci.* 2015;16:16981–7004.
5. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev.* 2005;9:11–24.
6. Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Liu XY, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX. Melatonin in the oral cavity: physiological and pathological implications. *J Periodont Res.* 2015;50:9–17.
7. Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and Its Relation to the Immune System and Inflammation. *Ann NY Acad Sci.* 2006;917:376–386.
8. Salarić I, Karmelić I, Lovrić J, Baždarić K, Rožman M, Čvrljević I, i sur. Salivary melatonin in oral squamous cell carcinoma patients. *Sci Rep.* 2021;11:13201.
9. Almughrabi OM, Marzouk KM, Hasanato RM, Shafik SS. Melatonin levels in periodontal health and disease. *J Periodontal Res.* 2013;48:315–321.
10. Permuy M, López-Peña M, González-Cantalapiedra A, Muñoz F. Melatonin: A Review of Its Potential Functions and Effects on Dental Diseases. *Int J Mol Sci.* 2017;18:865.
11. Salarić I. Određivanje koncentracije melatonina u slini oboljelih od planocelularnog karcinoma usne šupljine [doktorski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet; 2019. 180 str.
12. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A Review of the Multiple Actions of Melatonin on the Immune System. *Endocrine.* 2005;27:189–200.
13. Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ. Melatonin: Potential Functions in the Oral Cavity. *J Periodontol.* 2007;78:1094–1102.
14. García-Mauriño S, Pozo D, Calvo JR, Guerrero JM. Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines: Nuclear action of melatonin on immune system. *J Pineal Res.* 2000;29:129–137.
15. Srinivasan V, Maestroni G, Cardinali D, Esquifino A, Perumal SP, Miller S. Melatonin, immune function and aging. *Immun Ageing.* 2005;2:17.
16. Rocha N, Rotelli A, Aguilar C, Pelzer L. Structural Basis of the Anti-inflammatory Activity of Melatonin. *Arzneimitt Forsch.* 2011;57:782–786.

17. Hernández-Gil IFT, Gracia MAA. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11:151-157.
18. Hernández-Gil IFT, Gracia MAA, Jerez B. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11:47-51.
19. López-Martínez F, Olivares Ponce PN, Guerra Rodríguez M, Martínez Pedraza R. Melatonin: Bone Metabolism in Oral Cavity. *Int J Dent*. 2012;2012:1-5.
20. Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin Promotes Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *J Biol Chem*. 1999;274:22041-22047.
21. Nakade O, Koyama H, Arijji H, Yajima A, Kaku T. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *J Pineal Res*. 1999;27:106-110.
22. Radio NM, Doctor JS, Witt-Enderby PA. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT<sub>2</sub> melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. *J Pineal Res*. 2006;40:332-342.
23. Koyama H, Nakade O, Takada Y, Kaku T, Lau K -H. W. Melatonin at Pharmacologic Doses Increases Bone Mass by Suppressing Resorption Through Down-Regulation of the RANKL-Mediated Osteoclast Formation and Activation. *J of Bone & Mineral Res*. 2002;17:1219-1229.
24. Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Muñoz F, Lopez-Peña M, Stephenson J, i sur. Melatonin stimulates osteointegration of dental implants. *J Pineal Res*. 2008;45:174-179.
25. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 1990;85:632-639.
26. Halleen JM, Räisänen S, Salo JJ, Reddy SV, Roodman GD, Hentunen TA, i sur. Intracellular Fragmentation of Bone Resorption Products by Reactive Oxygen Species Generated by Osteoclastic Tartrate-resistant Acid Phosphatase. *J Biol Chem*. 1999;274:22907-22910.
27. Cutando A, Gómez-Moreno G, Villalba J, Ferrera MJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Relationship between salivary melatonin levels and periodontal status in diabetic patients. *J Pineal Res*. 2003;35:239-244.
28. Balaji TM. Gingival, Plasma and Salivary Levels of Melatonin in Periodontally Healthy Individuals and Chronic Periodontitis Patients: A Pilot Study. *J Clin Diagn Res*. 2015; 9:23-25.
29. Kara A, Akman S, Ozkanlar S, Tozoglu U, Kalkan Y, Canakci CF, i sur. Immune modulatory and antioxidant effects of melatonin in experimental periodontitis in rats. *Free Radic Biol Med*. 2013; 55: 21-26.
30. Cutando A, Lopez-Valverde A, Gomez-de-Diego R, Arias-Santiago S, de Vicente-Jimenez J. Effect of gingival application of melatonin on alkaline and acid phosphatase,

- osteopontin and osteocalcin in patients with diabetes and periodontal disease. *Med Oral*. 2013; 657–663.
31. Cutando A, López-Valverde A, de Diego RG, de Vicente J, Reiter R, Herrero Fernández M, i sur. Effect of topical application of melatonin to the gingiva on salivary osteoprotegerin, RANKL and melatonin levels in patients with diabetes and periodontal disease. *Odontology*. 2014; 102: 290-296.
  32. Brailo V. Stomatolog i rano otkrivanje oralnog karcinoma. *Acta Med Croatica*. 2015;69:45-48.
  33. Nakamura E, Kozaki K, Tsuda H, Suzuki E, Pimkhaokham A, Yamamoto G, i sur. Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor 1 A (MTNR1A) in oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2008;99: 1390–1400.
  34. Lin FY, Lin CW, Yang SF, Lee WJ, Lin YW, Lee LM, i sur. Interactions between Environmental Factors and Melatonin Receptor Type 1A Polymorphism in Relation to Oral Cancer Susceptibility and Clinicopathologic Development. *PLoS ONE*. 2015;10: 0121677.
  35. Moradkhani F, Moloudizargari M, Fallah M, Asghari N, Heidari Khoei H, Asghari MH. Immunoregulatory role of melatonin in cancer. *J Cell Physiol*. 2020;235:745–757.
  36. Reiter RJ. Mechanisms of cancer inhibition by melatonin: Editorial Note. *J Pineal Res*. 2004;37:213–214.
  37. Lin P, Tung Y, Chen H, Chiang Y, Hong H, Huang K, i sur. Melatonin activates cell death programs for the suppression of uterine leiomyoma cell proliferation. *J Pineal Res*. 2020;68:12620.
  38. Lu H, Wu B, Ma G, Zheng D, Song R, Huang E, i sur. Melatonin represses oral squamous cell carcinoma metastasis by inhibiting tumor-associated neutrophils. *Am J Transl Res*. 2017;9:5361-5374.
  39. Blask DE. Melatonin uptake and growth prevention in rat hepatoma 7288CTC in response to dietary melatonin: melatonin receptor-mediated inhibition of tumor linoleic acid metabolism to the growth signaling molecule 13-hydroxyoctadecadienoic acid and the potential role of phytomelatonin. *J Carcinog*. 2004;25:951–960.
  40. Leon-Blanco MM, Guerrero JM, Reiter RJ, Calvo JR, Pozo D. Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro. *J Pineal Res*. 2003; 35:204–211.
  41. Kilic E, Kilic Ü, Reiter RJ, Bassetti CL, Hermann DM. Prophylactic use of melatonin protects against focal cerebral ischemia in mice: role of endothelin converting enzyme-1. *J Pineal Res*. 2004;37:247–251.
  42. Lissoni P, Barni S, Mandala M, Ardizzoia A, Paolorossi F, Vaghi M, i sur. Decreased Toxicity and Increased Efficacy of Cancer Chemotherapy Using the Pineal Hormone Melatonin in Metastatic Solid Tumour Patients with Poor Clinical Status. *Eur J Cancer*. 1999; 35:1688-1692.

43. Stanciu A, Zamfir-Chiru-Anton A, Stanciu M, Stoian A, Jinga V, Nitipir C, i sur. Clinical significance of serum melatonin in predicting the severity of oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2020;19:1537-1543.
44. Elsabagh HH, Moussa E, Mahmoud SA, Elsaka RO, Abdelrahman H. Efficacy of Melatonin in prevention of radiation-induced oral mucositis: A randomized clinical trial. *Oral Dis.* 2020;26:566–572.
45. Brailo V, Boras VV, Juras DV, Rogulj AA, Brzak BL, Alajbeg I. Oral Side Effects of Head and Neck Irradiation. U: Akarlan Z, urednik. *Diagnosis and Management of Head and Neck Cancer* [Internet]. InTech; 2017 [citirano 11. rujana 2022.]. Dostupno na: <https://www.intechopen.com/chapters/55403> doi: 10.5772/intechopen.68961
46. Takechi M, Tatehara S, Satomura K, Fujisawa K, Nagayama M. Effect of FGF-2 and melatonin on implant bone healing: a histomorphometric study. *J Mater Sci Mater Med.* 2008; 19: 2949-2952.
47. Muñoz F, López-Peña M, Miño N, Gómez-Moreno G, Guardia J, Cutando A. Topical Application of Melatonin and Growth Hormone Accelerates Bone Healing around Dental Implants in Dogs. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012;14:226-235.
48. Tresguerres IF, Clemente C, Blanco L, Khraisat A, Tamimi F, Tresguerres JAF. Effects of Local Melatonin Application on Implant Osseointegration. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012;14:395–399.
49. Salomó-Coll O, de Maté-Sánchez JEV, Ramírez-Fernandez MP, Hernández-Alfaro F, Gargallo-Albiol J, Calvo-Guirado JL. Osseoinductive elements around immediate implants for better osteointegration: a pilot study in foxhound dogs. *Clin Oral Impl Res.* 2016;0:1–9.
50. Guardia J, Gómez-Moreno G, Ferrera MJ, Cutando A. Evaluation of Effects of Topic Melatonin on Implant Surface at 5 and 8 Weeks in Beagle Dogs: Melatonin and Osteointegration of Dental Implants. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2011;13:262–268.
51. Calvo-Guirado JL, Aguilar Salvatierra A, Gargallo-Albiol J, Delgado-Ruiz RA, Maté Sanchez JE, Satorres-Nieto M. Zirconia with laser-modified microgrooved surface vs. titanium implants covered with melatonin stimulates bone formation. Experimental study in tibia rabbits. *Clin Oral Impl Res.* 2015;26:1421–1429.
52. Gibbs FP, Vriend J. The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *J Endocrinol.* 1981;109:1796-1798.
53. Cutando A, Gomez-Moreno G, Arana C, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Melatonin reduces oxidative stress because of tooth removal. *J Pineal Res.* 2007;42:419–420.
54. Cutando A, Arana C, Gómez-Moreno G, Escames G, López A, Ferrera MJ, i sur. Local Application of Melatonin Into Alveolar Sockets of Beagle Dogs Reduces Tooth Removal–Induced Oxidative Stress. *J Periodontol.* 2007;78:576–583.
55. Soybir G, Topuzlu C, Odabas O, Dolay K, Bilir, A, Köksoy F. The effects of melatonin on angiogenesis and wound healing. *Surg. Today* 2003, 33, 896–901.

56. Sook-Bin W, Greenberg M. Ulcerative, vesicular, and bullous lesions. U: Greenberg M. et al. *Burket's Oral Medicine*. Hamilton: BC Decker; 2008. str. 58-61.
57. Yavuz T, Kaya D, Behçet M, Ozturk E, Yavuz Ö. Effects of melatonin on *Candida* sepsis in an experimental rat model. *Adv Therapy*. 2007;24:91–100.
58. Terron MP, Cubero J, Barriga C, Ortega E, Rodriguez. AB. Phagocytosis of *Candida albicans* and Superoxide Anion Levels in Ring Dove (*Streptopelia risoria*) Heterophils: Effect of Melatonin. *J Neuroendocrinol*. 2003;15:1111–1115.
59. Saeralaathan S, Rajkumar A, Balaji TM, Raj AT, Ganesh A. Salivary melatonin is depleted in patients with dental caries due to the elevated oxidative stress. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2021;11:547–551.
60. Aras HÇ, Ekström J. Melatonin-evoked *in vivo* secretion of protein and amylase from the parotid gland of the anaesthetised rat. *J Pineal Res*. 2008;45:413–421.
61. Cevik-Aras H, Godoy T, Ekstrom J. Melatonin-induced protein synthesis in the rat parotid gland. *J Physiol Pharmacol*. 2011;62:95-99.



## 7. ŽIVOTOPIS

Ivona Barišić rođena je 29.7.1997. godine u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole upisuje Gimnaziju Sesvete koju završava 2016. godine. Iste godine upisuje Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija sudjeluje na brojnim simpozijima i radionicama te međunarodnoj studentskoj razmjeni. Na završnim godinama studija volontira na Zavodu za parodontologiju te Zavodu za oralnu kirurgiju.