

UNIVERZITET U BEOGRADU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Milan V. Vučetić

ISPITIVANJE UTICAJA
PIJEZOELEKTRIČNOG EFEKTA NA
ĆELIJSKE I MOLEKULARNE
MEHANIZME ZARASTANJA
ORALNOHIRURŠKE RANE KOD
PACIJENATA SA DIJABETES
MELITUSOM TIP 1 i 2

Doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF DENTAL MEDICINE

Milan V. Vučetić

THE INFLUENCE OF PIEZOELECTRIC
EFFECT ON A CELLULAR AND
MOLECULAR MECHANISM OF ORAL-
SURGICAL WOUND HEALING IN
PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS
TYPE 1 AND 2

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021.

MENTOR

Prof. dr Bozidar Brković, Stomatološki fakultet, Univerziteta u Beogradu

KOMISIJA ZA OCENU I ODBRANU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

Prof. dr Aleksa Marković, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Miroslav Andrić, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Jelena Roganović, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Branislav Bajkin, Klinika za stomatologiju Vojvodine, Medicinski fakultet,
Univerzitet u Novom Sadu

DATUM ODBRANE

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija predstavlja dragoceno profesionalno iskustvo i veoma značajan period u mojem životu, zato bih iskoristio ovu priliku i iskreno se zahvalio ljudima koji su bili sa mnom na ovom putu, a svojim intelektom doprinose inspirisanju drugih.

Najveću zahvalnost dugujem mentoru, prof. dr Božidaru Brkoviću, koji me je vodio putem naučno-istraživačkog rada i učio me prvim koracima u oralnoj hirurgiji, na pruženom strpljenju, poverenju i nesebičnoj pomoći, a tako je doprinosa izgradnji mojeg hirusškog i naučnog razmišljanja. Zahvaljujući našem zajedničkom trudu doktorska disertacija je ugledala svetlost dana.

Takođe, veliku zahvalnost dugujem prof. dr Jeleni Roganović na osmišljavanju eksperimentalnog dela istraživanja, kao i na savetima i idejama koje je utkala i unapredila kvalitet ove doktorske disertacije.

Želim da se zahvalim dr Nini Petrović na pomoći u sprovođenju eksperimentalnih epigenetskih ispitivanja na institutu za nuklearne nauke 'Vinča', kao i pruženoj pomoći prilikom pisanja dela disertacije koji se na njih odnosio.

Zahvalan sam dr Ljiljani Djukić i dr Mariji Milić na pomoći tokom prikupljanja i obrade podataka pojedinih faza kliničkog i eksperimentalnog dela istraživanja.

Zahvalio bih se prof. dr Dubravku Bokonjiću na velikoj stručnoj pomoći pri statističkoj obradi prikupljenih podataka.

Hvala celokupnom osoblju Klinike za Oralnu hirurgiju, Stomatološkog fakulteta u Beogradu, specijalizantima i doktorandima, na ukazanoj podršci tokom ovog perioda, razmenjivanju znanja i iskustava, ali i na lepo provedenim zajedničkim trenucima.

Hvala svim mojim prijateljima, rođacima i kumovima koji su bili uz mene, sve ove godine.

Za uvek i neizmerno hvala mojim dragim roditeljima, Joki i Vojislavu, braći Bojanu i Zoranu, na bezuslovnoj ljubavi i beskrajnoj podršci koju od njih imam u životu, za sve što su mi omogućili i učinili da danas budem taj koji jesam.

Na kraju, najveću snagu i podstrek u svemu ovome dobio sam od svoje supruge Ane i sina Aleksandra koji su, na sebi svojstven način, proživljavali i pratili me na ovom putu prema doktoratu znanosti, a bili su moj veliki motiv, oslonac, energija i utjeha. Oni su verovali u mene, podsticali me da istrajem i na tome sam im neizmerno zahvalan.

Milan V. Vučetić

Uvod: Trauma mekog i koštanog tkiva u toku hirurške ekstrakcije impaktiranih umnjaka u donjoj vilici se klinički manifestuje pojavom bola, otoka i trizmusa, a koje nastaju kao posledica inflamatornih procesa u tkivima. Težina postoperativnog oporavka pacijenata zavisi od karakteristika koštanog tkiva oko impaktiranog zuba, kao i od stepena hirurške traume, koja se javlja u toku uklanjanja koštanog tkiva da bi se pristupilo vađenju zuba. Pijezohirurško sečenje kosti, kao minimalno invazivan hirurški pristup, doprinosi smanjenju hirurške traume alveolarnog koštanog tkiva i okolne mukoze i na taj način doprinosi prevazilaženju ograničenja konvencionalnih pristupa u ekstrakcijama donjih impaktiranih umnjaka. Štaviše, rezultati histoloških i histomorfometrijskih analiza koštanog tkiva na animalnom modelu ukazali su da su pijezohirurške osteotomije, za razliku od konvencionalnih, praćene intenzivnijim stvaranjem koštanog tkiva, kao i smanjenom broju inflamatornih ćelija. Trauma intraoralnog mekog i koštanog tkiva u toku hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka, kao i u toku procedura komplikovanih ekstrakcija višekorenih zuba je najvećim delom uslovljena intenzitetom povređivanja tkiva primenjenom hirurškom tehnikom, kao i posledičnim inflamatornim odgovorom organizma. Preterano oslobađanje pro-inflamatornih i pro-angiogenih molekula, kao što je interleukin 1 (IL-1), faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF) i slobodnih kiseoničnih radikala (ROS) utiče na intenzitet pojave bola, otoka i ograničenog otvaranja usta nakon hirurške ekstrakcije umnjaka u donjoj vilici.

Pacijenti oboleli od dijabetes melitusa (DM) imaju povećan rizik za pojavu otežanog zarastanja koštanog i mekog tkiva, kao i mogućnost za nastankom postoperativnih infekcija rane. Mehanizmi koji učestvuju u patofiziologiji poremećaja mekotkivnog i koštanog zarastanja u stanjima DM zasnivaju sa na međusobnoj povezanosti hiperglikemije, pro-inflamatorne ćelijske signalizacije i oksidativnog stresa. Molekule koje se od skoro smatraju bitnim faktorom u regulisanju inflamatornog odgovora i oksidativnog stresa u DM pripadaju familiji mikroRNK molekula (miRs). Štaviše, miR-21, jedna od najviše izučavanih molekula miR-a, predstavlja važnu kariku u regulaciji inflamatornog odgovora organizma kao posledicu hirurške traume tkiva. Konačno, miR-21 je uključena u kontroli bioloških funkcija epigenetskom modulacijom svojih target gena, odnosno kontrolom njihove transkripcije i posledične sinteze faktora rasta, kao što su matriksna-metaloproteinaza-9 (MMP-9), fosfataza i tenzin homolog (PTEN) i aktivnost enzima superoksid-dizmutaze (SOD).

Cilj: Ciljevi ove doktorske disertacije bili su da se ispita efekat pijezohirurgije na kliničke parametre neposrednog postoperativnog oporavka pacijenata, kao i na nivoe regulatora ranog inflamatornog odgovora procesa zarastanja alveolarnog koštanog tkiva (miR-21, interleukin 1 β (IL-1 β), VEGF i aktivnost SOD enzima u uzorcima koštanog tkiva), na modelu hirurške ekstrakcije impaktiranih umnjaka u donjoj vilici kod zdravih i pacijenata obolelih od dijabetes melitusa tip 1 (DM 1). Ciljevi su bili, takođe, praćenje efekta pijezohirurgije na parametre zarastanja ekstrakcionih alveola i na nivoe faktora rasta, kao signalnih molekula uključenih u regulaciji rane faze zarastanja koštanog tkiva (miR-21, VEGF, MMP-9, PTEN i aktivnost SOD enzima) na modelu komplikovane ekstrakcije višekorenih zuba u gornjoj vilici, kod zdravih i pacijenata obolelih od dijabetes melitusa tip 2 (DM 2).

Materijal i metod: Ova prospektivna, jednostruko slepa, randomizovana i kontrolisana klinička studija je sprovedena iz dva dela. U prvom delu studije je bilo uključeno 26 zdravih i 5 DM 1 pacijenata sa bilateralnim i simetrično impaktiranim umnjacima u donjoj vilici, indikovanih za hiruršku ekstrakciju, primenom pijezo ili standardne hirurgije, u studiji ukrštenog dizajna. U toku hirurške intervencije beleženo je vreme trajanja osteotomije, kao i ukupno vreme trajanje hirurške intervencije. Kao parametri postoperativnog oporavka kod pacijenata registrovani su: intenzitet bola (meren vizuelnom analognom skalom-VAS), vreme koje protekne do javljanja prvog postoperativnog bola i uzimanja prvog analgetika, ukupan broj analgetika uzetih u prvih 72 časa nakon hirurške intervencije, intenzitet trizmusa i otoka. Ekspresija miR-21 molekula, nivoi IL-1 β i VEGF proteina, kao i aktivnost SOD enzima su ispitivani u uzorcima alveolarnog koštanog tkiva. Drugi dio studije, obuhvatajući 32 zdrava i 32 DM 2 pacijenta, odnosio se na komplikovane ekstrakcije višekorenih zuba u gornjoj vilici, primenom pijezo i standardnog hirurškog pristupa. Ukupno vreme potrebno da se izvede ekstrakcija, kao i vremena trajanja osteotomije i odontotomije su registrovani u toku svake intervencije. Ispitivani klinički parametri u ovom delu istraživanja bili su: intenzitet bola (VAS), vreme koje protekne do javljanja prvog postoperativnog bola i uzimanja prvog analgetika, ukupan broj uzetih analgetika u prvih 24 časa nakon hirurške intervencije, klinički izgled gingivalnih tkiva, indeks zarastanja, residualni volumena, kao i stopa epitelizacije postekstrakcionih alveola. Na ćelijskom i molekularnom nivou ovog dela istraživanja ispitivane su i poređene

vrednosti ekspresije miR-21 molekula, nivoi VEGF, MMP-9 i PTEN proteina, kao i aktivnost SOD enzima u uzorcima koštanog tkiva zdravih i DM 2 pacijenata.

Rezultati: Nakon hirurške ekstrakcije impaktiranih umnjaka u donjoj vilici kod zdravih pacijenata, vreme javljanja prvog bola, kao i vreme uzimanja prvog analgetika bilo je statistički značajno kraće na strani gde je primenjena standardna tehnika. Intenzitet bola bio je statistički značajno manji u piježohirurškoj grupi prvog postoperativnog dana. Trizmus je bio značajno izraženiji nakon primene standardne hirurgije trećeg postoperativnog dana. Takođe, nakon primene standardne tehnike, postojalo je značajno povećanje u intenzitetu trizmusa trećeg u poređenju sa prvim postoperativnim danom. Ukupno vreme trajanja hirurške intervencije, kao i vreme potrebno da se izvede osteotomija, bilo je statistički značajno duže nakon primene piježohirurgije u odnosu na standardnu tehniku, kako u grupi zdravih, tako i u grupi DM 1 pacijenata. Ekspresija molekula miR-21 je bila statistički značajno veća, dok je koncentracija oslobođenog VEGF proteina bila značajno smanjena u koštanom tkivu, nakon primene piježohirurgije u poređenju sa standardnom hirurgijom. Statistički značajna razlika nije postojala u nivou IL-1 β , kao i u aktivnosti SOD enzima između ispitivanih hirurških tehnika. Vreme potrebno da se izvede osteotomija i odontotomija u toku komplikovanih ekstrakcija višekorenih zuba je bilo statistički značajno duže u toku primene piježohirurgije u odnosu na standardnu tehniku u grupi zdravih i DM 2 ispitanika. Štaviše, trajanje piježohirurških osteotomija je bilo značajno duže u grupi DM 2 u odnosu na piježohirurške osteotomije vršene kod zdravih pacijenata. Ukupna dužina trajanja komplikovanih ekstrakcija je bila podjednaka između ispitivanih hirurških tehnika u grupi zdravih pacijenata. Sa druge strane, dužina trajanja ekstrakcija u grupi DM 2 ispitanika je bila značajno veća nakon primene piježohirurgije u odnosu na standardnu hirurgiju. Intenzitet bola bio je značajno manji nakon primene piježohirurgije u odnosu na standardnu tehniku u grupi zdravih, kao i u grupi DM 2 ispitanika. Vreme javljanja prvog postoperativnog bola je bilo značajno produženo nakon primene piježohirurgije u odnosu na standardnu tehniku u grupi zdravih i u grupi DM 2 ispitanika. Takođe, vreme uzimanja prvog postoperativnog analgetika je bilo značajno produženo nakon primene piježohirurgije, u odnosu na standardnu hirurgiju u grupi zdravih ispitanika. Sa druge strane, u DM 2 grupi, nije postojala značajna razlika u vremenu uzimanja prvog analgetika nakon primene ispitivanih hirurških tehnika. Broj ispitanika u DM 2 grupi koji je osetio bol je bio

statistički značajno veći u odnosu na broj pacijenata koji su osetili bol u grupi zdravih pacijenata u prvih 24 sata, nakon primene i piježohirurgije i standardne hirurgije. Takođe, u grupi DM 2 ispitanika nakon primene piježohirurgije postojao je značajno manji broj pacijenata koji su uzeli analgetik u odnosu na broj pacijenta koji su osetili bol. Statistički značajna razlika registrovana je između DM 2 pacijenata, kod kojih je značajno manji broj pacijenata uzeo analgetik, nakon primene piježohirurgije u odnosu na primenjenu standardnu tehniku. Izgled gingive postekstrakcione alveole, neposredno nakon intervencije, bio je statistički značajno bolji nakon primene piježohirurgije u odnosu na standardnu ekstrakciju u grupi zdravih, kao i u grupi DM 2 ispitanika. Takođe, statistički značajno manje vrednosti ovog indeksa su bile prisutne i sedmog postoperativnog dana u DM 2 grupi nakon primene piježohirurgije. Piježohirurgija je takođe bila praćena statistički značajnim smanjenjem u vrednostima izgleda gingive, u grupi zdravih i DM 2 ispitanika, sedmog u odnosu na treći postoperativni dan. Vrednosti indeksa zarastanja su bile statistički značajno manje nakon primene piježohirurgije, u odnosu na standardnu tehniku, kod zdravih i DM 2 ispitanika, neposredno nakon hirurške intervencije. Sedmog u odnosu na treći postoperativni dan dolazilo je do statistički značajnog smanjenja vrednosti indeksa zarastanja u grupama zdravih i DM 2 ispitanika tretiranih piježohirurgijom. Analiza stope epitelizacije promera ekstrakcionih alveola je pokazala da je smanjenje BO promera u prvih sedam dana, kao i MD promera od trećeg do sedmog dana, bilo značajnije nakon primene standardne hirurgije u grupi DM 2 ispitanika. Na molekularnom nivou registrovana je značajna razlika u ekspresiji miR-21, kao i nivoima VEGF i MMP-9 proteina u koštanom tkivu uzetom piježohirurgijom u odnosu na standardnu hirurgiju, ali samo kod zdravih pacijenata, dok ove razlike između ispitivanih hirurških tehnika nije bilo u grupi DM 2 pacijenata. Štaviše, značajna razlika između zdravih i DM 2 pacijenata je registrovana u nivoima VEGF i PTEN proteina, nezavisno od primenjenih hirurških tehnika, kao i u koncentraciji MMP-9 proteina, ali samo nakon upotrebe piježohirurgije. Konačno, u uzorcima alveolarnog koštanog tkiva DM 2 pacijenata je registrovan značajno veći nivo ekspresije molekula miR-21 u odnosu na zdrave pacijente nakon primene i piježo i standardne hirurške tehnike.

Zaključak: Piježohirurška ekstrakcija impaktiranih umnjaka u donjoj vilici je praćena boljim postoperativnim oporavkom pacijenta usled manjeg intenziteta bola i trizmusa

(tkivni nivo), kao i značajno većom ekspresijom miR-21 (molekularni nivo), a smanjenim nivoom VEGF proteina (ćelijski nivo) u alveolarnom koštanom tkivu zdravih pacijenata. Dijabetes melitus tip 2 nije značajno menjao kvalitet kliničkog zarastanja postekstrakcione alveole (tkivni nivo), primenom pijezo i standardne hirurgije, dok je značajno uticao na promenu u nivoima VEGF, MMP-9 i PTEN proteina (ćelijski nivo), kao i povećanje ekspresije molekula miR-21 (molekularni nivo), kada se komplikovana ekstrakcija višekorenih zuba u gornjoj vilici vršila primenom pijezo-hirurgije.

Ključne reči: pijezo-hirurgija, umnjak, postoperativni oporavak, DM tip 1 i 2, komplikovana ekstrakcija zuba, miR-21, VEGF, MMP-9, SOD, PTEN

Naučna oblast: Stomatološke nauke

Uža naučna oblast: Kliničke stomatološke nauke

THE INFLUENCE OF PIEZOELECTRIC EFFECT ON CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISM OF ORAL-SURGICAL WOUND HEALING IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 1 AND 2

Introduction Postoperative pain, trismus, and swelling reflect inflammatory events following removal of impacted mandibular third molar and are mostly related to surgical injury. The occurrence of postoperative discomfort is associated with bone properties, as well as with degree and mode of bone removal. Piezosurgical mode of bone cutting is a minimally invasive surgical approach that may reduce osteotomy-associated injury to alveolar bone and surrounding soft tissue, and helps overcome limitations of conventional third molar surgical treatment. Furthermore, histological and histomorphometric evidence in animal models demonstrated increased bone formation, as well as lower number of inflammatory cells in sites treated by piezoelectric devices compared with sites where conventional bone-cutting was used. Surgical trauma to the soft and hard tissue during removal of impacted mandibular third molars, as well as complex teeth exodontia is mostly influenced by the extent of tissue injury and consequential inflammation. The substantial production of pro-inflammatory and pro-angiogenic molecules, such as Interleukin 1 (IL-1), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Reactive Oxygen Species (ROS) results in postoperative outcomes such as: pain, swelling, and limited mouth opening.

Patient with diabetes mellitus have an increased risk for impaired bone and soft tissue healing and they can experience higher occurrence of postoperative infection. Mechanism underlying diabetes-induced impairment of bone and soft tissue healing were attributed to the mutually interrelated processes of hyperglycemia, pro-inflammatory signaling and oxidative stress. Molecules that have recently emerged as critical factors in regulation of inflammation and oxidative stress in DM are the microRNAs (miRs). Moreover, one of the mostly studied miRs is miR-21 and has been recognized as molecular regulators of inflammation following tissue injury. Finally, miR-21 is involved in regulation of biological functions through epigenetic control of its target genes for transcription and synthesis of various growth factors and enzymes of antioxidant defense, such as matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), phosphatase and tensin homologue (PTEN) and superoxide dismutase (SOD).

Aim The aims of this doctoral dissertation were to investigate the effects of piezosurgery on clinical parameters of immediate postoperative patient's discomfort and level of inflammation-related regulators of bone repair mechanism (miR-21, interleukin 1 β (IL-1 β), VEGF and SOD enzyme activity in bone specimens) after lower third molar surgery in healthy and patients with diabetes mellitus type 1 (DM 1). Moreover, the influence of piezosurgery is further evaluated on the parameters of postextraction's socket healing, as well as on levels of bone repair regulators (miR-21, VEGF, MMP-9, PTEN and SOD enzyme activity) following complex exodontia of upper multi-rooted teeth in healthy and diabetes mellitus type 2 (DM 2) patients.

Material and method This prospective, single blind, randomized, controlled clinical study was performed in two parts. One part of study included twenty-six healthy and five DM 1 patients with symmetrically impacted mandibular third molars, who underwent either piezo or conventional surgery in a split-mouth design study. Intraoperatively, duration of intervention, as well as the time needed to perform osteotomy was recorded in each individual case. Parameters of postoperative discomfort were: pain intensity (recorded with Visual Analogue Scale-VAS), the first pain appearance, analgesic first use and total dose taken in the first 72 hours, trismus, and swelling. MiR-21 expression, IL-1 β , and VEGF proteins, as well as superoxide dismutase (SOD) activity in alveolar bone, were evaluated. Following part of the study involved 32 healthy and 32 DM 2 patients, who underwent either piezosurgical or conventional complex multi-rooted tooth extraction in upper jaw. Total time for tooth extraction, as well time needed to perform osteotomy and odontotomy were recorded in each patient. Evaluated clinical parameters were: pain intensity (VAS), the first pain appearance, analgesic first use and total dose taken in the first 24 hours, clinical appearance of gingival tissue, healing index and residual socket volume, as well as the epithelisation rate of post extraction sockets. At cellular and molecular levels, the expression of miR-21, VEGF, MMP-9, PTEN protein level and SOD enzyme activity were evaluated and compared in alveolar bone specimens obtained from healthy and DM 2 patients.

Results Following third molars surgical extraction in healthy patients, the first postoperative pain was reported and the first analgesic was taken significantly sooner after utilizing conventional technique. Pain intensity was significantly decreased in

piezosurgical group on the 1st postoperative day. Significantly pronounced trismus on the 3rd postoperative day and significant increase in trismus on the 3rd vs. 1st day postoperatively were found in conventional group. The total time of surgical procedure, as well as time needed to complete osteotomy were significantly prolonged in piezosurgery group of healthy, as well as DM 1 patients. In bone specimens of healthy patients, mir-21 relative expression was significantly higher, whereas the amount of VEGF protein was significantly decreased in piezosurgery group. No significant differences in IL-1 β and SOD levels were found between groups. The time needed to perform osteotomy and odontotomy during complex exodontia were significantly longer after utilising piezosurgery in healthy and DM 2 patients. Moreover, duration of piezosurgical osteotomy in DM 2 group was significantly longer, when compared with piezosurgical osteotomy in healthy subjects. The total time of complex exodontia was equal between piezo and conventional technique in the group of healthy patients, whereas in DM 2 group piezosurgically-assisted teeth extractions were followed with significantly longer total duration of interventions. The pain intensity was significantly decreased, the first postoperative pain reported and first analgesic was taken significantly later after utilizing piezosurgery for complex teeth extraction in healthy and DM 2 patients. In DM 2 group, significantly higher number of patients experienced postoperative pain, when compared with the number of those in healthy group. Moreover, in DM 2 group, piezosurgical extractions were followed by significantly smaller number of patients who took analgesic when compared with the patients, who experienced postoperative pain. Conventional teeth extractions in DM 2 group were followed with significantly greater number of patients who took analgesics when compared with the number of those after piezosurgical extractions. Piezosurgical complex exodontia was followed by decreased values in clinical appearance of gingival tissue immediately after surgery in both groups, as well as in DM 2 group, on 7th postoperative day. This technique was also followed by significant decrease in the score of clinical gingival appearance values on 7th, when compared with 3rd postoperative day. Healing index was significantly lower after utilising piezosurgery on the day of surgery in healthy and DM 2 group. Moreover, piezosurgery was followed by significant decrease in the healing index values when 7th was compared with 3rd postoperative day. Conventional complex teeth extractions were followed by significantly increased bucco-oral (during first 7th day) and mesio-distal (from 3rd to 7th postoperative day) epithelisation rate in

DM 2 group. At the cellular level, piezosurgical complex exodontia in healthy patients was followed with significant decrease in VEGF and increase in MMP-9 protein levels, when compared with conventional approach. In DM 2 patients, VEGF and MMP-9 protein levels were significantly decreased, while PTEN protein level was significantly increased, when compared with healthy individuals, after utilising either piezo or conventional approach. At the molecular level, significantly increased expression of miR-21 was found in the spacimens obtained with piezo vs. conventional surgery in healthy patients. Moreover, conventional and piezosurgical complex exodontia were followed by significant increase in the expression of miR-21 molecules in bone spacimens obtained from DM 2, when compared with healthy patients.

Conclusion Piezosurgical wisdom teeth extractions in healthy patients were associated with better postoperative patient's recovery in terms of pain and trismus (tissue level), followed with higher mir-21 relative expression (molecular level) and decreased level of VEGF protein (cellular level) in bony tissue. Diabetes mellitus has not influenced the quality of postextraction socket healing (tissue level), while it has had significant impact on changes in VEGF, MMP-9 and PTEN protein levels (cellular level), as well as it has induced significantly increased expression of miR-21 molecules (molecular level), following piezosurgically-assisted complex exodontia of upper jaw.

Keywords piezosurgery, wisdom teeth, postoperative discomfort, DM type 1 and 2, complex exodontia, miR-21, VEGF, MMP-9, SOD, PTEN

Scientific field Dental Science

Specific scientific field Clinical Dental Science

SADRŽAJ

UVOD.....	1
PIJEZOHIRURGIJA.....	2
Pijezoelektrični fenomen i specifičnost rada pijezoaparata.....	2
Istorijat primene pijezoahirurgije.....	4
Kliničke karakteristike pijezoahirurških osteotomija.....	5
Biološke karakteristike pijezoahirurških osteotomija.....	9
Ograničenja u primeni pijezoahirurgije.....	10
ZARASTANJE INTRAORALNOG MEKOG I KOŠTANOG TKIVA.....	11
Fiziološki mehanizmi u zarastanju intraoralnog mekog i koštanog tkiva.....	11
Značaj mikroRNK u zarastanju intraoralnog mekog i koštanog tkiva.....	12
Značaj VEGF-a u zarastanju intraoralnog mekog i koštanog tkiva.....	13
Značaj oksidativnog stresa u zarastanju intraoralnog mekog i koštanog tkiva.....	13
KARAKTERISTIKE MEKOG I KOŠTANOG TKIVA U DIJABETES	
MELITUSU.....	14
Opšte karakteristike dijabetes melitusa.....	14
Mehanizmi nastanka komplikacija kao posledica dijabetes melitusa.....	15
Promene na koštanom tkivu uzrokovane dijabetes melitusom.....	17
Poremećaj zarastanja rana u dijabetes melitusu.....	19
NAUČNA OSNOVA PROBLEMA.....	22
CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	24
HIPOTEZA.....	27
MATERIJAL I METOD.....	29
ETIČKI STANDARD.....	30
DIZAJN ISTRAŽIVANJA.....	30
ISPITIVANI PACIJENTI I KRITERIJUMI ZA UKLJUČIVANJE I	
ISKLUČIVANJE IZ STUDIJE.....	32
HIRURŠKA EKSTRAKCIJA DONJIH IMPAKTIRANIH UMNJAKA.....	33
Klinički parametri.....	36
Trajanje intervencije i osteotomije.....	36
Parametri postoperativnog toka.....	36

Praćenje neželjenih efekata.....	38
Laboratorijski parametri.....	38
Kvantitativno određivanje ekspresije miR-21 molekula, nivoa VEGF, IL-1 β proteina i aktivnosti SOD enzima.....	38
Uzimanje uzorka koštanog tkiva.....	39
Postupak kvantifikacije VEGF-a, IL-1 β i SOD-a u uzorcima koštanog tkiva...	40
Postupak kvantifikacije ekspresije miR-21 u uzorcima koštanog tkiva.....	40
Izolacija molekula RNK iz zamrznutih uzoraka koštanog tkiva.....	40
Lančana reakcija polimeraze kojoj prethodi reverzna transkripcija korišćenjem prajmera sa petljom (<i>Stem-Loop RT-qPCR</i>).....	42
KOMPLIKOVANO VAĐENJE VIŠEKORENIH ZUBA.....	43
Klinički parametri.....	45
Trajanje intervencije, osteotomije i odontotomije.....	45
Parametari postoperativnog toka.....	45
Praćenje neželjenih efekata.....	48
Laboratorijski parametri.....	49
Kvantitativno određivanje ekspresije miR-21 molekula, nivoa VEGF, MMP-9, PTEN proteina i aktivnosti SOD enzima.....	49
Uzimanje uzorka koštanog tkiva.....	49
Postupak kvantifikacije VEGF-a, MMP-9 i PTEN-a, SOD-a u uzorcima koštanog tkiva.....	50
Postupak kvantifikacije ekspresije miR-21 u uzorcima koštanog tkiva.....	51
STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA.....	52
REZULTATI.....	53
Klinički parametri postoperativnog toka nakon hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka primenom pijezohirurgije i standardne hirurgije kod zdravih pacijenata	54
Studijski dijagram toka istraživanja, snaga studije, veličina uzorka, karakteristike ispitanika i trajanja intervencije.....	55
Parametri postoperativnog toka (bol, trizmus i otok).....	58
Laboratorijski parametri mereni u uzorcima koštanog tkiva uzetim u toku hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka primenom pijezohirurgije i standardne hirurgije kod zdravih pacijenata	61

Ekspresija molekula miR-21 molekula, nivoi VEGF, IL-1 β proteina, i aktivnosti SOD enzima u uzorcima koštanog tkiva.....	62
Ispitivanje koeficijenta korelacije između kliničkih i laboratorijskih parametara nakon hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka primenom piježohirurgije i standardne hirurgije kod zdravih pacijenata.....	63
Klinički parametri postoperativnog toka nakon hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka primenom piježohirurgije i standardne hirurgije kod DM 1 pacijenata.....	67
Veličina uzorka, karakteristike ispitanika, trajanja intervencije i parametri postoperativnog toka (bol, trizmus i otok).....	68
Klinički parametri postoperativnog toka i zarastanja rana nakon komplikovane ekstrakcije višekorenih zuba primenom piježohirurgije i standardne hirurgije kod zdravih i DM 2 pacijenata.....	70
Studijski dijagram toka istraživanja, snaga studije i veličina uzorka.....	71
Demografske i osnovne kliničke karakteristike ispitivane populacije.....	73
Parametri evaluacije postoperativnog bola	76
Izgled gingive ekstrakcione alveole u toku procesa zarastanja.....	78
Indeks zarastanja i rezidualni volumen postekstrakcione alveole.....	81
Epitelizacija ekstrakcionih rana.....	86
Laboratorijski parametri mereni u uzorcima koštanog tkiva uzetim u toku komplikovane ekstrakcije višekorenih zuba u gornjoj vilici primenom piježohirurgije i standardne hirurgije kod zdravih i DM 2 pacijenata.....	92
Ekspresija miR-21 molekula, nivoi VEGF, MMP-9, PTEN proteina i aktivnosti SOD enzima u uzorcima koštanog tkiva	93
DISKUSIJA.....	95
ZAKLJUČCI.....	120
LITERATURA.....	124
BIOGRAFIJA.....	165

UVOD

PIJEZOHIRURGIJA

Pijezoelektrični fenomen i specifičnost rada pijezoaparata

Pijezoelektrični fenomen, poznat još i kao indirektan pijezo efekat, predstavlja fizički princip koji se generiše pri mehaničkim deformacijama pijezoelektričnih kristala u neizmeničnom električnom polju. Preciznije, primena neizmenične struje na polarizovanu površinu kvarcne ploče ili pijezoaktivnih keramičkih diskova, rezultiraće njihovom kristalnom ekspanzijom u pravcu polariteta i sledstvenom perpendikularnom kontrakcijom, produkujući serije vibracija. Na taj način generisana visokofrekventna vibrirajuća energija (25-35 kHz), prenesena posebnim sistemom prenosnika (transdjusera) na metalni nastavak, dovodi do njegovih mikrometričnih, visokofrekventnih, linearnih i recipročnih pokreta do 300 µm amplitude (O'Daly BJ i sar., 2008; Spinelli G i sar., 2014). Pijezoelektrične vibracije su slične vibracijama ultrazvučnih aparata za uklanjanje zubnog kamenca u stomatologiji, međutim pijezohirurški aparati imaju tri do šest puta veću snagu (Pavlikova G i sar. 2011).

Pijezoaparat je sastavljen iz tela, koje se aktivira pomoću nožnog prekidača, zatim ručice i velikog broja nastavaka različitih oblika i veličina u zavisnosti od hirurške indikacije (Slika 1). Telo aparata poseduje monitor, tastaturu, peristaltičnu pumpu, kao i držače za ručicu i kontenjer sa rastvorom za hlađenje pijezohirurških nastavaka (Slika 1). Na tastaturi postoje komande koje omogućavaju biranje odgovarajućeg programa rada aparata i podešavanje količine protoka rastvora za hlađenje nastavaka. U najvećem broju slučajeva postoje četiri osnovna moda rada pijezohirurškog aparata, podešenih u odnosu na četiri tipa gustine i čvrstoće koštanog tkiva (D1, D2, D3 i D4), prema klasifikaciji Lekholma i Zarba (Lekholm U, Zarb GA, 1985). Step en koštane mineralizacije je faktor koji determiniše frekvenciju vibracija pijezoaparata, da bi se obezbedilo efektivno sečenje koštanog tkiva. Sa tim u vezi, D1 mod se karakteriše visokim frekvencama vibracija (do 35 kHz) i predodređen je za rad u visokomineralizovanom koštanom tkivu, dok se niže frekvence vibracija, kao što je D4 mod, koriste za manje mineralizovanu kost. Količina protoka rastvora za hlađenje nastavaka u toku rada se može podešavati od 0 do 60 ml/min pomoću peristaltične pumpe. Sečivna moć pijezohirurškog aparata je zasnovana na formiranju ultrasoničnih talasa pomoću pijezokeramičkih diskova smeštenih u ručici aparata. Pijezokeramički diskovi nakon izlaganja električnom polju, proizvedenom spoljnim generatorom

smeštenim u telu, manjanju svoj volumen generišući ultrazvučne vibracije. Nadalje, proizvedene vibracije se usmeravaju u pojačalo, iz kojeg se preko prenosnika, prenose na nastavke ušrafljene na vrhu ručice.



Slika 1. Telo piježohirurškog aparata sa držačem rezervoara rastvora za hlađenje (a), set piježohirurških nastavaka korišten u ekstrakcijama zuba (b), piježohirurški nastavci korišteni u 'sinus lift' procedurama (c), ručica piježohirurškog aparata u kojoj su smešteni piježokeramički diskovi (d)

U hirurgskoj praksi, podela piježohirurških nastavaka izvršena je prema morfološkim i funkcionalnim osobinama i u odnosu na njihovu kliničku primenu.

Morfološka i funkcionalna klasifikacija piježohirurških nastavaka podrazumeva da morfološki izgled nastavka definiše njegova strukturna svojstva, dok funkcionalni opis ukazuje na njegove sečivne karakteristike. S tim u vezi, oštri nastavci imaju svojstvo sečenja, dijamantskim česticama pokriveni nastavci imaju abrazivna svojstva, dok zaobljeni nastavci služe za ravnjanje koštanih površina.

Klinička klasifikacija svrstava nastavke (oštre, abrazivne, ravnajuće) prema osnovnim hirurgskim tehnikama, kao što su osteotomija, osteoplastika i ekstrakcija. Na taj način, u zavisnosti od kliničke indikacije, piježohirurški nastavci se mogu grupisati u nastavke za vršenje: osteotomija, osteoplastika, ekstrakcija, pravljenja ležišta za ugradnju implantata, parodontalne hirurgije, endodontske hirurgije, *sinus lift* procedura, širenja alveolarnog grebena, uzimanja koštanih transplantata, ortodonske mikrohrurgije, procedura uklanjanja (eksplantacije) implantata (Vercellotti T, 2009).

Istorijat primene piježohirurgije

Reč 'piježo' vodi poreklo od grčke reči '*piezin*', šta znači 'pritisnuti jako, stisnuti' (*Free Dictionary, 2015*). Tokom 1880. godine, braća Pijer i Žak Kiri pronašli su 'piježoelektricitet'. Oni su zaključili da primena pritiska na različite kristale, keramičke materijale ili koštano tkivo proizvodi elektricitet (*American Physical Society, 2014*). Godinu dana kasnije, Gabriel Lipman je pronašao obrnut piježoelektrični efekat. On je pokazao da primenom električnog polja na kristal, dolazi do deformacije materijala (*American Physical Society, 2014*). Efekat je nadalje ispitivan od strane različitih naučnika i 1953. godine Katuna je objavio rad o primeni ultrazvuka na koštanom tkivu (*American Physical Society, 2014, Catuna MC, 1953*).

Poslednjih decenija, različiti istraživački timovi su ispitivali primenu ultrazvučnih vibracija u sečenju mineralizovanih tkiva (Mazorow HB, 1960; McFall TA i sar., 1961; Horton JE i sar., 1975). McFal i sar., su poredili zarastanje tkiva nakon upotrebe rotirajućih instrumenata u odnosu na oscilirajuće skalpele. Pronašli su da je zarastanje bilo sporije nakon primene oscilirajućeg skalpela, ali bez značajnijih komplikacija (McFall TA i sar., 1961). Sa druge strane, Horton i sar. su na animalnom modelu pokazali znatno ravniju površinu koštanog tkiva alveolarnog nastavka nakon primene rotirajućih instrumenata u odnosu na ultrazvučne vibrirajuće instrumente.

Međutim, koštana regeneracija je bila značajno brža nakon primene ultrazvučnih aparata (Horton JE i sar., 1975).

Imajući u vidu da hirurška trauma, kao lokalni stres, predstavlja jedan od značajnih faktora za zarastanje intraoralnih rana, kao zamena standardnoj hirurškoj tehnici, u oralnoj i maksilofacijalnoj hirurgiji je od skoro uvedena pijezohirurgija (Torrella F i sar., 1998; Vercellotti T i sar., 2000). Osnovni razlog za uvođenje pijezohirurgije u hirurškoj praksi bio je zasnovan na nedostacima standardne hirurške tehnike zbog potencijalnog mehaničkog i termičkog oštećenja kosti i mekog tkiva, usled strukturnih promena u tkivu i smanjenja njegovog vitaliteta u procesu regeneracije (Gulnihar Y i sar., 2013).

U stomatološkoj praksi pijezohirurgija se koristi u raznim hirurškim procedurama: atraumatskim ekstrakcijama zuba (Bluz C, Szmukler-Moncler S, 2010), hirurškim ekstrakcijama donjih impaktiranih umnjaka (Al-Moraissi EA i sar., 2016), produžavanja kliničkih kruna (Lavu V i sar., 2019), periapikalne hirurgije (Abella i sar., 2014), uklanjanja cističnih lezija (Abella F i sar., 2014), uklanjanja benignih koštanih tumora (Momesso G i sar., 2017), prepracije ležišta za ugradnju implantata (Scarano A i sar., 2018), podizanja poda maksilarnog sinusa '*sinus lift*' (Wallace SS i sar., 2007), uzimanja koštanih autotransplantata (Sohn DS i sar., 2007), širenja bezubog viličnog grebena (Danza M i sar., 2009), uklanjanja (eksplantacije) implantata (Marini E i sar., 2013), pomeranja donjoviličnog i bradnog nerva (Bovi M i sar., 2010; De Vicente JC i sar., 2016; Sakkas N i sar., 2008), ortognatske hirurgije (Spinelli G i sar., 2015; Pagotto L i sar., 2017), onkologije (Crosetti E i sar., 2009) i hirurgije temporomandibularnog zgloba (Spinelli G i sar., 2017).

Kliničke karakteristike pijezohirurških osteotomija

Pijezohirurgija, kao minimalno invazivna hirurgija, omogućava mikrometrično, selektivno sečenje mineralizovanog koštanog tkiva, koristeći definisane vrednosti ultrazvučnih frekvencija veličine od 24-32 kHz, pri čemu je smanjen rizik za oštećenja okolnih mekih tkiva i važnih anatomskih struktura, kao što su nervi, krvni sudovi, mukozne membrane i mišići (Labanca M i sar., 2008). Selektivnost sečenja, koja podrazumeva sečenje samo mineralizovanih tkiva, uslovljena je nižim ultrazvučnim frekvencijama vibracije pijezohirurških aparata. Preciznije, za razliku od mineralizovanih tkiva, mekotkivne strukture zahvaljujući svojoj vulnerabilnosti, imaju sposobnost da vibriraju bez oštećenja na istim frekvencama kao pijezohirurški

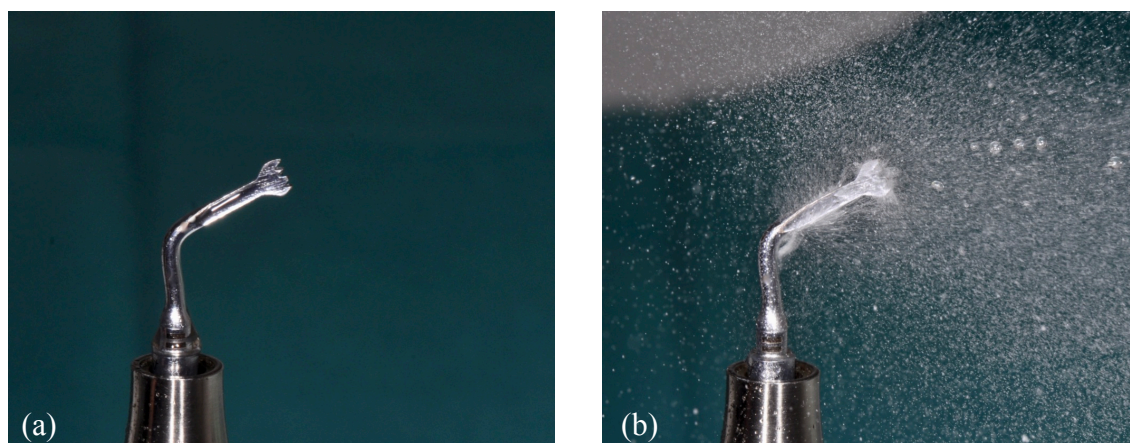
nastavak (24-32 kHz). Samim tim, rizik za nastanak traume vaskularnih i nervnih struktura se znatno smanjuje (Vercellotti T i sar., 2001; O'Daly BJ i sar., 2008; Labanca M i sar., 2008). Frekvencije vibracija od 25-35 kHz su specifične za sečenje samo mineralizovanih tkiva, kao što je kost, dok su za incizije na mekotkivnim strukturama potrebne znatno veće frekvencije vibracija (preko 50 kHz)(Vercellotti T i sar., 2001; O'Daly BJ i sar., 2008).

Preciznost pijezohirurškog sečenja zasniva se na mehaničkim mikrovibracijama ultrazvucnih frekvencija moduliranih soničnim talasima (Stubinger S i sar., 2008). Sonične i ultrazvučne vibracije (25-30 kHz) se proizvode mehaničkim šok talasima, koji vibriraju u linijskom pravcu (Stubinger S i sar., 2008), šta doprinosi da sečivni vrh radi sa redukovanim amplitudama vibracije (horizontalne 20-200 μm , vertikalne 20-60 μm). Na ovaj način pijezohirurški instrumenti ostvaruju svoju prednost rada u odnosu na konvencionalne metode sečenja koštanog tkiva. Zahvaljujući velikom broju različitih nastavaka, njihovim malim dimenzijama, kao i efektivnosti sečenja, sa pijezohirurškim instrumentima se može formirati precizna i tanka osteotomska linija u različitim pravcima i u regijama sa otežanim pristupom (Spinelli G i sar., 2015). Poznato je takođe da se osteotomije formirane pijezohirurškom tehnikom odlikuju glatkim koštanim zidovima (Claire S i sar., 2013) i očuvanom izvornom morfološkom strukturom koštanog tkiva (Maurer P i sar., 2008, Hollstein S i sar., 2012). Takođe, u skorašnjoj studiji na elektronskoj mikroskopiji, Blaskovic i sar. su pokazali značajnu razliku u izgledu koštanih defekata neposredno nakon hirurške intervencije, sa prisutnim ostacima koštanih fragmenata nakon korištenja standardnih svrdala, u poređenju sa čistim i ravnim koštanim zidovima, oštih ivica nakon pijezohirurških osteotomija (Blaskovic M i sar., 2016).

Za razliku od hirurških svrdala i testera, čija efikasnost sečenja koštanog tkiva zavisi od primenjenog pritiska, mikrometričko pijezohirurško sečenje se karakteriše manjim pritiskom radnog nastavka instrumenta na kost u toku rada, samim tim, i boljom intraoperativnom hirurškom kontrolom i smanjenom mogućnošću pregrejavanja kosti (Alam K i sar., 2011; Alam K i sar. 2013). Štaviše, preteran pritisak prilikom pijezohirurškog sečenja koštanog tkiva doprinosi sprečavanju vibracije nastavka, smanjuje efikasnost sečenja i generiše frikcionu toplotu (Hannet P, 2015). Istraživanje Claire i sar. je ukazalo da 150 g kontaktnog opterećenja, prilikom pijezohirurškog sečenja kosti, postiže najbolju dubinu sečenja, dok preveliki pritisak

na pijezohirurški nastavak, vodi smanjenju njegovih oscilacija i sečivne sposobnosti (Claire S i sar. 2013).

Pijezohirurško sečenje kosti se karakteriše manjim krvarenjem u poređenju sa hirurškim svrdlima i oscilirajućim testerama: gubitak krvi je smanjen za 25-30 % (Spinelli G i sar., 2014; Landes CA i sar., 2008). Smatra se da različiti faktori doprinose smanjenju gubitka krvi. Usled bolje vidljivost operativnog polja i manjeg rizika za oštećenje mekog tkiva, povreda krvnih sudova je smanjena. Štaviše, fenomen kavitacije, nastao kao posledica kontakta rastvora za hlađenje i pijezohirurškog nastavka u toku vibracije na ultrazvučnim frekvencijama, smatra se ogovornim sa relativno odsustvo krvi iz hirurške regije (Landes CA i sar., 2008). Fenomen kavitacije predstavlja formiranje mikromehurića pare u rastvoru za hladjenje nastavka. Mikromehurići se šire i kontrahuju kada su izloženi sinusoidalnim ultrasoničnim talasima. Po dostizanju rezonantne veličine, mehurići gasa kolabiraju formirajući udarne (*shock*) talase (Slika 2)(Lucas M, Mathieson A, 2015).



Slika 2. Pijezohirurški nastavak ušrafljen na vrhu ručice u mirovanju (a), fenomen kavitacije nastao kao posledica kontakta rastvora za hlađenje i piezohirurškog nastavka u toku vibracije na ultrazvucnim frekvencijama (b).

Sa kliničkog aspekta, kavitacija dovodi do bolje vidljivosti operativne regije usled raspršivanja rastvora za hlađenje u obliku aerosololi koji, u suštini, dovodi do spiranja krvi sa osteotomskih zidova. Nadalje, ovaj fenomen ima hemostatski efekat, jer uzrokuje zaustavljanje krvarenja iz kapilara tokom sečenja kosti (Labanca M i sar., 2008). Pokazano je da efekat kavitacije cepa ćelijski zid bakterija i tako ima antibakterijski efekat (Yaman Z, Suer BT, 2013). Sa tim u vezi, udarni talasi u vodenoj

sredini doprinose smanjenju broja bakterija i uklanjanju debrisa, ostvarujući antiseptičko dejstvo na osteotomskim površinama i doprinose njihovom čišćenju (Walsh LJ, 2007; Rahnana M i sar., 2013)

Pijezohirurgija proizvodi manje vibracija i buke, jer koristi mikrovibracije za sečenje koštanog tkiva, za razliku od makrovibracija i znatno izraženije buke, koju prave konvencionalni osteotomski instrumenti (Sohn DS i sar., 2007). Pokazano je da pijezohirurške mikrovibracije i redukovana buka doprinose smanjenju psihološkog stresa i straha kod pacijenata prilikom osteotomija (Sohn DS i sar., 2007). Studija Chang i sar. je ukazala na značajno bolji doživljaj ekstrakcije zuba i primenjenog pritiska u toku rada kod pacijenata nakon primene pijezohirurgije u odnosu na standardnu tehniku, prilikom hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka (Chang HH i sar. 2015).

Rezultati kliničkih studija su ukazali na značajno smanjenje postoperativnog edema i hematoma nakon primene pijezohirurgije u odnosu na oscilirajuće testere u maksilofacijalnoj hirurgiji (Spinelli G i sar., 2014). Takođe, meta-analiza Al-Moraissia i sar. pokazala je da pijezohirurgija statistički značajno redukuje mogućnost pojave postoperativnog trizmusa, edema i bola, kao i potrebe za uzimanjem analgetika u poređenju sa standardnom tehnikom nakon hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka (Al-Moraissi EA et al., 2016). Nadalje, prilikom preparacije ležišta za ugradnju implantata pomoću pijezohirurgije pokazano je da pacijenti imaju znatno manju potrebu za uzimanjem analgetika, kao i znatno manju pojavu bola u odnosu na konvencionalnu preparaciju (Maglione M i sar., 2019). Altiparmak i sar. su pronašli da je incidenca privremenih parestezija kože i mukoze bila statistički značajno manja nakon primene pijezohirurgije u odnosu na standardnu tehniku, pri uzimanju autolognih koštanih transplantata u predelu simfizne regije (Altiparmak N i sar., 2015). U ortognatskoj hirurgiji, pijezohirurške osteotomije praćene su znatno manjim gubitkom krvi, kao i znatno manjim poremećajem nervnih senzacija (Pagotto L i sar., 2017). U toku *sinus lift* procedura, pokazano je da korišćenjem pijezohirurške tehnike u toku formiranja pristupnog otvora na prednjem zidu tela maksile, dolazi do značajno manje mogućnosti perforacije sluzokože poda maksilarnog sinusa, u odnosu na standardni pristup pravljenja koštanog otvora dijamantskim svrdlima (Jordi C i sar., 2018).

Biološke karakteristike pijezohirurških osteotomija

Brojne histološke i molekularne studije koštanog zarastanja nakon primene pijezohirurgije ukazale su na njene prednosti u odnosu na primenjene konvencionalne tehnike (Mouraret i sar., 2014; Otake i sar., 2018; Pereira i sar., 2018). Sa tim u vezi, mikroskopske analize osteotomskih defekata formiranih pijezohirurškom tehnikom karakterišu se odsustvom koštanih fragmenata, uglavnom nastalih nakon primene konvencionalnih svrdala, zatim odsustvom pigmentacija usled pregrejavanja i očuvanim vitalitetom osteocita i osteoblasta na osteotomskim površinama (Blaskovic i sar., 2016; Harder i sar., 2009; Haghgoo i sar., 2017; Mouraret i sar., 2014). Štaviše, za razliku od nepravilnih koštanih osteotomskih površina sa brojnim mikropukotinama, prekrivenih koštanim fragmentima i nepravilnih ivica nakon primene svrdala i oscilirajućih testera (Giraud JY i sar., 1991; Tehemar Sh, 1999; Panduric DG i sar., 2012; Panduric DG i sar., 2014), pijezohirurške osteotomije se odlikuju ravnim i perfektno čistim površinama prekrivenim fibrinom (Blaskovic M i sar., 2016).

Histološke i histomorfometričke analize zarastanja koštanog tkiva na animalnom modelu su ukazale na značajno bolji kvalitet i kvantitet koštanog tkiva nakon osteotomije izvedene pijezohirurškom tehnikom u odnosu na standardnu tehniku (Vercellotti T i sar., 2005). Takođe, istraživanja Ma i sar., pokazala su na animalnom modelu veće prisustvo novoformiranog dobro vaskularizovanog koštanog tkiva i aktivnu koštanu remodelaciju u ranoj fazi zarastanja (7 i 14 dan), dok su Yang i Girod ukazali na znatno bržu koštanu remodelaciju i regeneraciju nakon primene pijezohirurgije, u odnosu na standardnu tehniku (Ma L i sar., 2013; Yang BE, Girod S, 2014). U ranoj fazi zarastanja kosti, Preti i sar., su pokazali manji broj inflamatornih ćelija, niži nivo ekspresije proinflamatornih citokina faktora nekroze tumora-alfa (TNF- α), interleukina 1 beta (IL-1 β), IL-10, ali veći broj osteoblasta i povećanu ekspresiju koštanog morfogenskog proteina 4 (BMP-4) i tkivnog faktora rasta-beta 2 (TGF- β 2) na koštanim površinama formiranim pijezohirurškim pristupom, u odnosu na standardnu tehniku osteotomije (Preti G i sar. 2007).

Protektivni uticaj pijezohirurških instrumenata na strukturalna i funkcionalna svojstva mekih tkiva je, do sada, ispitivan u brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama (Metzger MC i sar., 2006, Shaeren S i sar., 2008; Pavlikova G i sar., 2011; Stoetzer i sar., 2014; Otake Y i sar., 2018). Sa tim u vezi, rezultati Shaeren i sar., su pokazali da

direktan rad pijezohirurškog nastavaka na površinu shijatičnog nerva (*n. ischiadicus*) miša, pri jakom pritisku (1.5, N) i trajanju od 5 sekundi, ne dovodi do presecanja nerva, već uzrokuje strukturalna i funkcionalna oštećenja. Štaviše, autori Shaeren i sar., su pokazali da perineurium nerva ostaje intaktan čak i nakon primene sile od 3 N u trajanju od 1 sekunde, ukazujuću na postojanje potencijala za njegov potpuni funkcionalni oporavak (Shaeren S i sar., 2008). Takođe, pijezohirurško odizanje periosta u *in vivo* uslovima, praćeno ja očuvanom periostalnom mikrocirkulacijom, dok konvencionalni pristup primenom periostalnih elevatora je imao značajno manju funkcionalnu gustinu kapilara (Stoetzer M i sar., 2014). Konačno, skorašnja studija Otake i sar., pokazala je da primena pijezohirurgije na površinu jezika miša, ne dovodi do oštećenja epitela i jezičnih papila, za razliku od konvencionalnih okruglih i fisurnih svrdala, koje prosecaju jezik čitavom debljinom, uzrokujući oštećenje svih njegovih tkiva (epitela, submukoze i mišića) (Otake Y i sar., 2018).

Ograničenja u primeni pijezohirurgije

Pijezohirurgija se karakteriše znatno sporijim sečenjem kosti u odnosu na osteotomije vršene standardnim svrdlima ili oscilirajućim testerama (Spinelli G i sar., 2014; Pavlikova G et al., 2011, Barone A i sar., 2010; Rashad A i sar., 2015). Ipak, neprestano poboljšanje pijezohirurške tehnologije i proizvodnja znatno efikasnijih pijezo aparata doprinose poboljšanju brzine njegovog rada (Anessi A i sar., 2018). S druge strane, ovaj parametar brzine rada je proporcionalan sa iskustvom u primeni pijezohirurgije u svakodnevnoj hirurškoj praksi (Spinelli G i sar., 2014; Rashad A i sar., 2015, Beziat JL i sar., 2007). Kao ograničenje pijezohirurške tehnike smatra se i ekonomičnost njegove primene. Potom, primena pijezohirurgije kod pacijenata sa ugrađenim pejsmejkerima smatra se kontraindikacijom, jer ultrazvučne vibracije mogu inhibirati ritam rada pejsmejкера, uzrokovati privremene poremećaje u modalitetu stimulacije ili ga reprogramirati (Aly, 2018). Sa druge strane, Gomez i sar., su pokazali da direktan kontakt pijezohirurškog nastavka na *in vitro* model pejsmejкера, ne prouzrokuje elektromagnetne smetnje u njegovom radu (Gomez G i sar., 2013).

ZARASTANJE INTRAORALNOG MEKOG I KOŠTANOG TKIVA

Fiziološki mehanizmi u zarastanju intraoralnog mekog i koštanog tkiva

Zarastanje intraoralnih rana predstavlja složen biološki proces zarastanja mekog i koštanog tkiva koji se odvija, kako na tkivnom (diferencijacija i proliferacija ćelija), tako na ćelijskom (promene nivoa signalnih molekula i produkcija tkivnog matriksa) i molekularnom nivou (ekspresija gena). Proces fiziološkog zarastanja mekog tkiva obuhvata pet faza (hemostaza, inflamatorna reakcija i debridman, proliferativna faza, epitelizacija i remodelacija) (Loots MA i sar., 1999), koje, kao visoko strukturirani i sukcesivno povezani reparatorni mehanizmi, obuhvataju osnovne biološke aktivnosti fagocitoze, pozitivne hemotakse ćelija, njihove mitogeneze, kao i sintezu kolagena i ostalih komponenti matriksa.

Neposredno posle traume mekog tkiva, kordinirani proces zarastanja obuhvata ćelijsku reakciju iz okoline rane po tačno određenom redosledu, koji započinje sinhronizovanom aktivnošću trombocita, neutrofila, limfocita i makrofaga (Bates DO i sar., 2003). Nadalje, usled prisutne vazodilatacije, migracije i proliferacije endotelnih ćelija, započinje proces formiranja novih krvnih sudova, koji ima poseban značaj u procesu zarastanja intraoralnog mekog tkiva (Drinkwater SL i sar., 2002; Folkman J i sar., 1992; Bao P i sar., 2009). Konačno, proces zarastanja se završava epitelizacijom i sazrevanjem vezivno tkivne strome (Squier CA, Finkelstein MW, 1998).

Zarastanje intraoralnog koštanog tkiva jeste fiziološki proces koji pokreće kaskadu vremenski regulisanih i lokalnih bioloških aktivnosti zasnovanih na višestrukim unutarćelijskim i vanćelijskim mehanizmima (Einhorn TA i sar., 1998; Sandberg MM i sar., 1993), koji se odvija na tri funkcionalna nivoa: tkivnom, ćelijskom i molekularnom (Marsell R, Einhorn TA, 2011), što uključuje mobilizaciju brojnih ćelijskih komponenti i faktora rasta u procesu osteogeneze. S tim u vezi, osnovne faze osteogeneze u intramenbranoznom tipu osifikacije su zasnovane: prvo, na formiranju centara osifikacije u vezivnom tkivu, zatim stvaranju koštanog nemineralizovanog matriksa (osteoida), nastanku mlade nezrele kosti i periosta, kao i modelaciju novoformirane trabekularne kosti (Duan X i sar., 2016).

U procesima zarastanja mekog i koštanog tkiva, centralno mesto među brojnim mehanizmima zauzima post-translaciona regulacija genske ekspresije predvođena molekulima iz mikroRNK familije, koji kontrolišu signalizaciju i međućelijsku

komunikaciju u toku ćelijske diferencijacije, proliferacije, migracije, odgovora na stres, kao i angiogeneze, posredstvom faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF) i parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite (Waki T i sar., 2016; Banerjee J, Sen CK, 2015; Schipiani E i sar., 2009; Bates DO i sar., 2003; Sen CK i sar., 2008; Wauquier F i sar., 2009).

Značaj mikroRNK u zarastanju intraoralnog mekog i koštanog tkiva

MikroRNK (miR) molekule su vrsta nekodirajućih RNK (dužine do 21 ili 23 nukleotida), koje negativno regulišu ekspresiju ciljanih gena i kordinišu najveći broj ćelijskih procesa u toku zarastanja, uključujući i ćelijski odgovor na traumu (Olejniczak M i sar., 2018; Leung AK i sar., 2010). Jedna od najviše istraživanih miR molekula je miR-21, eksprimirana svestrano i kao neposredan odgovor na stres, a uključena je u zaštiti ćelija usled izlaganja toploti, hipoksiji, traumi i oksidativnom stresu (Cheng Y i sar., 2009; Li CL i sar., 2018; Zhang T i sar., 2019; Permenter MG i sar., 2019). Mehanizmi koji objašnjavaju njeno protektivno svojstvo obuhvataju antiinflamatorni efekat, ispoljen u obliku regulacije signalnih puteva, kao što je put nuklearnog faktor kappa pojačivača aktiviranih B ćelija (*eng. nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells (NF-κB)*)(Tahamtan A i sar., 2018), i suprimiranjem oksidativnog stresa i apoptoze (Chang YF i sar., 2009). Pokazano je da inflamacijom modularana molekula miR-21 pokazuje narušenu ekspresiju u toku zarastanja prvih sat vremena nakon hirurške traume, koja može biti prisutna čak i u prvih 24 sata, učestvujući u regulaciji traumom indukovane inflamacije (Li P i sar., 2019; Toldo S i sar., 2014). Takođe, pokazano je da su neki od aspekata angiogeneze u toku zarastanje, kao što je proliferacija, migracija i morfogeneza endotelinih ćelija regulisani od strane specifičnih miR molekula, nazvanih još i angiomiR, u koje se ubraja i miR-21 (Banerjee J, Sen CK, 2015). Sa druge strane, poznato je da miR-21 predstavlja značajan postranskripcioni regulator procesa koštane remodelacije u fiziološkim ili stanjima inflamacije (Chen N i sar., 2016). Konačno, potvrđeno je da u toku zarastanja koštanog tkiva ekspresija miR-200 i miR-21 ima značajnu ulogu u diferencijaciji, proliferaciji, migraciji i apoptozi osteogenih ćelija, kao odgovor na povećani nivo oksidativnog stresa (Bartel DP, 2009; Huntzinger E i sar., 2011; Winter J i sar., 2009; Magenta A i sar., 2013).

Značaj VEGF-a u zarastanju intraoralnog mekog i koštanog tkiva

Imajući u vidu da se VEGF sintetiše i produkuje, kako u endotelnim ćelijama (Uchida K i sar., 2007; Namiki A i sar., 1995), tako i u ćelijama dobro vaskularizovanih glatkih mišića (Brogi E i sar., 1994; Stavri GT i sar., 1995), njegovo prisustvo u procesu zarastanja intraoralnog mekog tkiva leži u mehanizmima deobe i rasta endotelnih ćelija i regulisanju propustljivosti zida krvnog suda (Bao P i sar., 2009; Bates DO i sar., 2002). Takođe, VEGF je značajna komponenta i u procesu hemotakse, pošto se produkuje i u trombocitima (Banks RE i sar., 1998), neutrofilima (Gaudry M i sar., 1997) i makrofazima (Berse B i sar., 1992). Od posebnog značaja za zarastanje mekog tkiva je činjenica da VEGF utiče na epitelizaciju, deponovanje kolagena u toku angiogeneze (Stojadinović OKA i sar., 2007), i da sprečava apoptozu endotelnih ćelija krvnih sudova (Makinen T i sar., 2001).

U regeneraciji koštanog tkiva, VEGF produkuje, pored endotelnih ćelija i ćelije osteogeneze, kao što su: osteoprogenitorske ćelije, osteoblasti i osteoblastima slične ćelije (Uchida S i sar., 2003; Berendsen AD i Olsen BR, 2014). Kao direktan stimulator angiogeneze, njegovo prisustvo je od značaja za ranu osteogenezu (Schipani E i sar., 2009), pošto povećava ekspresiju drugih signalnih molekula na nivou endotela, čime indukuje mezenhimalne stem ćelije i diferencira ih u pravcu osteogeneze (Yang YQ i sar., 2012; De Souza Nunes i sar., 2010). Štaviše, njegova pojačana ekspresija utiče i na diferencijaciju osteoblasta, kao i na mobilizaciju osteoklasta (Zelzer E i sar., 2004; Zelzer E i Olsen BR, 2005; Berendsen AD, Olsen BR, 2014), čime VEGF igra važnu ulgu u interakciji dva osnovna procesa zarastanja koštanog tkiva – angiogeneze i osteogeneze.

Značaj oksidativnog stresa u zarastanju intraoralnog mekog i koštanog tkiva

Jedan od bitnih faktora koji utiču na fiziološki proces regeneracije koštanog i mekog tkiva jeste postojanje ravnoteže između stvaranja reaktivnih kiseoničnih radikala (ROS) i nitritnih radikala (RNS) sa jedne strane, i molekula i enzima antioksidativne zaštite (glutation, superoksid dizmutaza - SOD, katalaza, glutacion peroksidaza) sa druge strane. Narušavanje ove fiziološke ravnoteže, u pravcu povećane produkcije ROS i RNS, ili smanjene aktivnosti antioksidativne zaštite dovodi do nastanka oksidativnog stresa (Soneja A i sar., 2005)

Pošto je zarastanje mekog i koštanog tkiva regulisano različitim signalnim molekulama (Werner S i sar., 2003; Schafer M i sar., 2007), pokazano je da ROS i u malim koncentracijama, učestvuje, kako u regulisanju transdukcionih procesa i ekspresije gena na molekularnom nivou (Sen CK i sar., 2000; Sen CK, Packer L, 1996; Sen CK, 2000, Sen CK, 1998), tako i u promeni koncentracije VEGF proteina na ćelijskom nivou (Sen CK i sar., 2002; Khanna S i sar., 2001; Cho M i sar., 2001). S tim u vezi, u koštanom tkivu povećana koncentracija ROS značajno utiče na proces koštane resorpcije i smanjenu aktivnost osteoblasta.

KARAKTERISTIKE MEKOG I KOŠTANOG TKIVA U DIJABETES MELITUSU

Opšte karakteristike dijabetes melitusa

Dijabetes melitus (DM) se definiše kao grupa metaboličkih oboljenja, nastalih usled poremećaja metabolizma ugljenih hidrata, masti i proteina, a karakteriše se povećanim nivoom glukoze u krvi (hiperglikemijom). DM može nastati usled smanjene ili potpuno odsutne sekrecije insulina nastale kao rezultat idiopatskog ili autoimunog oštećenja β ćelija endokrinog pankreasa (DM 1); ili kao posledica poremećene funkcije insulina, odnosno rezistencije ciljnih tkiva na sekretovani insulin udružene sa neadekvatnim kompenzatornim odgovorom njegove sekrecije (DM 2). Pored toga, DM se može javiti u drugom ili trećem trimestru trudnoće–gestacioni dijabetes, kao i biti posledica infektivnih, imunoloških, ili hemiskih oštećenja pankreasa (ADA, 2016).

DM predstavlja najučestalije hronično-metaboličko oboljenje prisutno kod 8,5% odraslih, preko 18 godina starosti (Svetska Zdravstvena Organizacija, 2016). Broj ljudi obolelih od DM se povećao sa 108 miliona u 1980. godini na 422 miliona u 2014. godini (Svetska Zdravstvena Organizacija, 2016), i predviđa se porast od 69 % broja obolelih u zemljama u razvoju, kao i 20 % u razvijenim zemljama u periodu između 2010. i 2030. godine (Shaw JE i sar., 2010). Među obolelim od DM, učestalost obolelih od DM 1 je 5-10%, dok DM 2 prisutan u oko 95% slučajeva (ADA 2016).

U faktore rizika koji doprinose nastanku DM ubrajaju se: gojaznost, smanjena fizička aktivnost, starostno doba, hipertenzija, dislipidemija, pušenje, kao i genetska i rasna/etnička predispozicija (ADA, 2016).

Sistemske komplikacije DM, nazvane još i hroničnim, mogu zahvatati velike krvne sudove i manifestovati se kao makroangiopatije (cerebrovaskularna bolest, koronarna bolest srca, kao i bolest perifernih arterija), ili biti lokalizovane u malim krvnim sudovima i dovesti do mikroangiopatija (retinopatija, neuropatija, nefropatija). Ove vaskularne abnormalnosti nastaju kao rezultat ireverzibilne neenzimske glikacije proteina, poremećaja u ćelijskom redoks-potencijalu, povećanja oksidativnog stresa, inflamatornih promena, kao i nastanka endotelne disfunkcije i stanja hiperkoagulabilnosti (Goldberg RB, 2009; Oliveira SF, Guillausseau PJ, 1998). Smatra se da je osnova za pomenuti poremećaj funkcije tkivnih, ćelijskih i molekularnih mehanizama u DM-u hronična hiperglikemija (Oguntibeju OO, 2019). Štaviše, sistemske komplikacije DM predstavljaju najčešće uzroke smrtnosti i morbiditeta pacijenata, a udružene su sa poremećajima u metabolizmu i zarastanju koštanog tkiva, kao i otežanim zarastanjem rana.

Mehanizmi nastanka komplikacija kao posledica dijabetes melitusa

Osnovu za nastanak sistemskih DM komplikacija predstavlja poremećaj u funkciji endotelnih ćelija krvnih sudova. Zapravo, u stanju hronične hiperglikemije endotelne ćelije imaju povećan rizik za nastanak intraćelijske hiperglikemije, jer glukoza u njih može penetrirati mehanizmom pasivne difuzije, za razliku od drugih ćelija, gde je potreban insulin. Akumulacija glukoze u endotelnim ćelijama, dovodi do aktivacije dodatnog metaboličkog puta razgradnje, odnosno puta aldozne redukcije, u kome enzimi aldozna reduktaza i sorbitol dehidrogenaza, katalizuju glukožu do sorbitola i sorbitol do fruktoze. U toku ovih reakcija, dolazi do oksidacije nikotinamid adenin dinukloid-fosfata (*eng. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-NADPH*) u NADP^+ , i redukcije NAD^+ u NADH . Povećan protok glukoze u sklopu ovog metaboličkog puta razgradnje, dovodi do promena u redoks potencijalu endotelnih ćelija, usled smanjenja ćeliskog NADPH i povećanja stope NADH/NAD^+ (Giannini C i sar., 2011).

Povećanje stope NADH/NAD^+ , uzrokovanog hiperglikemijom u endotelnim ćelijama, imitira uslove slične hipoksiji i na taj način dolazi do sledstvene aktivacije

proteina kinaze C (PKC). Aktivacija PKC, praćena sintezom azot-oksida (NO), uzrokuje povećanje vaskularne propustljivosti i kontraktilnosti, stimulisanje sinteze ekstracelularnog matriksa, deponovanje proteina i lipida, kao i zadebljanja bazalne membrane. Takođe, aktivacijom PKC indukuje se inflamatorni odgovor organizma oslobađanjem proinflamatornih citokina i molekula ćelijske adhezije, kao i stvaranje ROS-a posredstvom PKC zavisne aktivacije enzima NAD(P)H oksidaze (Domingueti CP i sar., 2016; Oguntibeju OO, 2019). Nadalje, poremećaji u intraćelijskom odnosu NADH/NAD⁺ dovode do povećanog oslobađanja superoksida usled aktivacije enzima NADH zavisne oksidaze, koja dalje oksidiše lipoproteine male gustine, čime se ostvaruje citotoksičan efekat na endotelnim ćelijama i smanjuje raspoloživost NO-a, vodeći nastanku endotelne disfunkcije (Giannini C i sar., 2011; Kessler L i sar., 1998).

Sa druge strane, proteini u ćelijama i tkivima, usled izlaganja aldozama u stanjima hronične hiperglikemije, bivaju podvrgnuti procesima glikacije i oksidacije, pri čemu dolazi do stvaranja ireverzibilnih krajnjih produkata glikolize (*eng. Advanced glycation end-product-AGEs*) (Thallas-Bonke V i sar., 2008). Pokazano je da AGEs produkti mogu dovesti do oštećenja tkiva putem formiranja međusobnih veza koje narušavaju strukturu i funkciju proteina, kao i vezivanjem za svoje AGEs receptore na membranama endotelnih ćelija, glatkih mišićnih ćelija, fibroblasta, limfocita, monocita i makrofaga, pri čemu dovode do aktivacije ćelijske signalizacije i genske ekspresije, indukujući oksidativni stress i sledstven inflamatorni odgovor organizma (Giacco F, Brownlee M, 2010). Preciznije, AGEs stimulacijom ćelijskih receptora dolazi do aktivacije NF-κB signalnog puta, koji dalje indukuje transkripciju različitih gena, kao što su: endotelin 1, molekul vaskularne ćelijske adhezije-1 (*eng. Vascular Cell Adhesion Molecule-1-VCAM-1*), E-selektin, trombomodulin, VEGF, Interleukin-1 (IL-1), IL-6, faktor nekroze tumora-α (TNF-α) i receptor za AGEs (*eng. Receptor for Advanced Glycation End products-RAGE*), sledstveno aktivirajući inflamatorno i prokoagulantno stanje, koje vodi endotelnoj aktivaciji (Giannini C i sar, 2011; Sena CM i sar., 2013). Povećanja ekspresija inflamatornih citokina i adhezivnih molekula dalje pojačava inflamatorni odgovor organizma i tako dovodi do posledičnog pogoršanja dijabetičnih vaskularnih komplikacija.

Dakle, stanje hronične hiperglikemije igra glavnu ulogu u nastanku mikro- i makrovaskularnih DM komplikacija, putem serije mehanizama koji podrazumevaju oslobađanje inflamatornih mediatora, a posredstvom oksidativnog stresa, ukazujući na

usku povezanost inflamacije i oksidativnog stresa u patofiziologiji dijabetes melitusa (Butkowski EG, Jelinek HF, 2017; Collier B i sar., 2008).

Promene na koštanom tkivu uzrokovane dijabetes melitusom

Diabetes melitus je udružen sa prisustvom brojnih komplikacija na koštanom sistemu, koje se jednim imenom nazivaju “dijabetično koštano oboljenje” ili “dijabetična osteopatija” (Bouillon R, 1991). Dijabetični koštani fenotip se karakteriše smanjenim linearnim koštanim rastom u toku puberteta kod adolescenata (Salerno M i sar., 1997; Bizzarri C i sar., 2014), smanjenom koštanom mineralnom gustinom, povećanim rizikom za nastak osteopenije i osteoporoze (Vestergaard P, 2007), povećanim rizikom za nastanak preloma kostiju (Jadhorbani M i sar., 2007), smanjenim potencijalom koštanog zarastanja i regeneracije (Cozen L, 1973; Choi WJ i sar., 2014; Liuni FM i sar., 2015).

Narušen kvalitet koštanog tkiva i povećan rizik za nastanak koštanih preloma predstavljaju značajne komplikacije DM (Janghorbani M i sar., 2006). Sa tim u vezi, poremećaji u koštanom metabolizmu i pojava mikroangiopatija dovode do prolongiranog zarastanja koštanog tkiva za 87% kod pacijenata obolelih od DM (Loder RT, 1988). Brojne kliničke studije su ukazale na otežano koštano zarastanje kod obolelih od DM, koje je praćeno usporenim stvaranjem i maturacijom koštanog kalusa (Cozen L, 1972; Loder RT, 1988; Bibbo C i sar., 2001). Nadalje, retrospektivna studija koja se bavila ispitivanjem uspešnosti tretmana preloma kostiju stopala, pokazala je da je prisustvo DM kod ispitanika bilo udruženo sa povećanim relativnim rizikom za nastanak komplikacija rane (Folk JW i sar., 1999). Staviše, studije serije slučajeva prikazale su prisustvo povećane učestalosti nastanka infektivnih komplikacija, usporenog ujedinjenja, neujedinjenja i redislokacije koštanih fragmenata, kao i nastanka pseudoartroze nakon hirurške terapija fraktura kod pacijenata obolelih od DM (Stuart MJ, Morrey BF, 1990; Papa J i sar., 1993; Tisdell CL i sar 1995).

Pacijenti oboleli od DM 1 su pod uticajem potpunog gubitka funkcije β ćelija pankreasa, koje je udruženo sa smanjenjem nivoa insulinu sličnog faktora rasta 1 (eng. *Insulin Growth Factor-IGF-1*). Nedostatak sekretovanog insulina i drugih anaboličkih hormona endokrinog pancreasa, kao i smanjenje nivoa IGF-1 suprimiraju diferencijaciju nediferentovanih mezenhimalnih stem ćelija u osteoblaste, kao i osteoblastnu aktivnost (Crane JL i sar., 2013). Stoga, dolazi do inhibicije skeletnog rasta u ranijim fazama odrastanja, koje dovodi do poremećaja u postizanju

maksimuma koštane mase (Hough FS i sar., 2016; Weber DR i sar., 2019; Shah VN i sar., 2019; Fuusager GB i sar., 2019; Gil-Diaz MC i sar., 2019). Sa druge strane, DM tip 2 utiče na koštanu strukturu u kasnijoj fazi bolesti, gde mnogi faktori, kao što su insulinopenija, hiperglikemija, oslobađanje AGEs, hronična inflamacija, mikroangiopatija i oksidativni stres dovode do narušavanja koštane mikroarhitekture i biomehaničkih karakteristika (Napoli N i sar., 2016; Napoli N i sar., 2014).

Dakle, značaj DM u koštanom zarastanju ogleda se u smanjenju diferencijacije mezenhimalnih stem ćelija u osteoblaste, kao i smanjenjem proliferacije i osteoblastne ćeliske funkcije (Weiss RE, Redi AH, 1980; Mc Cabe LR, 2007). Na smanjenu aktivnost osteoblasta ukazano je redukovanom ekspresijom mRNA za osteoklacin i kolagen tip 1 za oko 50% i kolagen tip 10 za oko 50-70% (Lu H i sar., 2003; Macey LR i sar., 1989; Topping RE i sar., 1994) u ranoj fazi koštanog zarastanja kod nekontrolisanog DM, kao i usled smanjenja broja i funkcije kapilara (Von Wilmskiy C i sar., 2010). Takođe, *in vitro* studije su pokazale da oksidativni stres u DM dovodi do inhibicije aktivnosti osteoblasta (Mody N i sar., 2001; Bai XC i sar., 2004) i indukuje njihovo oštećenje i apoptozu (Chen RM i sar., 2005). Štaviše, hiperglikemija, oksidativni stres i AGEs mogu imati štetan efekat na mezenhimalne progenitorske ćelije u pravcu njihove smanjene proliferacije, povećane apoptoze i inhibirane diferencijacije u osteoblaste (Lu H i sar., 2003; Bai XC i sar., 2004; Chen RM i sar., 2005; Kume S i sar., 2005; Stolzing A i sar., 2006). Sa tim u vezi, pokazano je da primena egzogenih antioksidanasa menja štetan efekat povećane koncentracije glukoze i ubrzava koštano zarastanje (Sheweita SA i Khoshhal KI, 2007; Hamada Y i sar., 2009; Zhen D i sar., 2010).

Konačno, značajnu ulogu u epigenetskoj kontroli inflamacije, osteogeneze i angiogeneze, u toku zarastanja koštanog tkiva, čine molekule miR-a, na osnovu regulacije transkripcije ciljanih gena i sledstvene kontrole odgovarajućih signalnih puteva (Waki T i sar., 2016). Sa tim u vezi, *in vivo* studija Takahara i sar., je ukazala da poremećena ekspresija pojedinih vrsta miRa, značajnih u kontroli inflamacije, osteogeneze i angiogeneze u DM uslovima, može predstavljati osnov u patofiziologiji narušenog DM koštanog zarastanja (Takahara S i sar., 2018).

Poremećaj zarastanja rana u dijabetes melitusu

Kao posledica mikroangiopatskih promena, hronične nezarasrajuće rane i ulceri na stopalima su često prisutne komplikacije kod pacijenata obolelih od DM. Štaviše, pokazano je da zarastanje rana nakon intraoralnih hirurških intervencija kod ovih pacijenata može biti usporeno i praćeno komplikacijama (Barash A i sar., 2008; Jacober SJ, Sowers JR, 1999).

Dakle, diabetične rane, uslovljene insuficijentnom angiogenezom, pokazuju smanjenu vaskularizaciju i gustinu kapilara, a klinički se manifestuju usporenim zarastanjem i povećanim rizikom za nastanak infekcije (Dinh T, Veves A, 2005). Angiogeneza, odnosno proces stvaranja novih krvnih sudova iz već postojeće krvne mreže, uslovljena je ravnotežom između stimulisanja rasta i proliferacije krvnih sudova sa jedne strane i njihove maturacije i mirovanja sa druge, u toku fiziološkog zarastanja. U dijabetičnim uslovima ova ravnoteže je narušena i dovodi do otežanog zarastanja i tkivne regeneracije, kao i usporene ponovne restitucije fiziološkog vaskularnog sistema (Okonkwo UA, DiPietro LA, 2017). Smatra se da usporeno zarastanje rane u DM je rezultat poremećaja u inflamatornoj i proliferativnoj fazi zarastanja u mekom tkivu (Loots MA i sar., 1999; Loots Ma i sar., 1998), usled promena u metabolizmu kolagena, fibrina i fibronektina i redukcije granulacionog tkiva (Ferguson MW i sar., 1996).

Zapravo, osnovu za otežano zarastanje dijabetičnih rana čine poremećaji u modulaciji tkivnih, ćelijskih i molekularih mehanizama koji koordinišu kompleksnu kaskadu procesa zarastanja. Na taj način dolazi do značajnog smanjenja ćelijske proliferacije i migracije, izmene međućelijskih signalnih puteva, kao i poremećaja genske ekspresije i sledstvenog smanjenjenja sinteze proteina, koje dalje vode poremećenoj angiogenezi, formiranju granulacionog tkiva i reepitelizaciji rana u dijabetičnim uslovima (Lim JZ i sar., 2017; Huang H i sar., 2015). Sa tim u vezi, pokazano je da makrofagi, ćelije urođenog imunog sistema sa bitnom ulogom u zarastanju, imaju narušenu funkciju u dijabetičnim ranama (Hold GL, El-Omar EM, 2008). Za razliku od pro-reparatornih karakteristika, koje ove ćelije imaju u fiziološkim stanjima, u dijabetičnim ranama deficit makrofaga ogleda se u poremećaju njihovog fenotipa i sledstvenom izostanku stimulacije reparatornih procesa u tkivu usled smanjenog oslobađanja citokina, interleukina i faktora rasta (Boniakowski AE i sar., 2017). Istraživanje Khanna i sar., su pokazala na modelu rane genetski modifikovanog DM miša da makrofagi poseduju smanjenu funkciju

eferocitoze, šta dovodi do nagomilavanja apoptotičnih ćelija i posledične pojačane inflamatorne reakcije organizma (Khanna S i sar., 2010). Poznato je da su makrofagi važan depo VEGF-a i drugih pro-angiogenih faktora zarastanja, tako da njihov deficit može biti povezan sa redukovanom angiogenezom, koja se očekuje u DM ranama. Nadalje, Seitz i sar., su pokazali da je nivo VEGF-A proteina i njegove mRNK u ranama genetski modifikovanog DM miša značajno smanjen u odnosu na zdrave jedinke (Seitz O i sar., 2010). Štaviše, Galiano i sar., su pronašli da tretiranjem rana genetski modifikovanog DM miša sa VEGF-A, dolazi do njihovog znatno bržeg zatvaranja u odnosu na kontrolne životinje (Galiano RD i sar., 2004).

Sa druge strane, fibroblasti, ćelije značajne za sekreciju faktora rasta, stimulaciju angiogeneze i reparaciju rane, imaju smanjen proliferativni kapacitet i abnormalne ćelijske morfološke karakteristike u dijabetičnim uslovima, kao što su prisustvo multi-lamelarnih i vezikularnih tela, odsustvo mikrotubularnih struktura, uvećan i proširen endoplazmatični retikulum, koji ukazuju na njihov hipertrofični fenotip u dijabetičnim ranama (Loots MA i sar., 1999). Ovi funkcionalni poremećaji predstavljaju relevantnu osnovu angiogenog deficita u dijabetičkim ranama, jer je poznato da fibroblasti imaju važnu ulogu u angiogenezi usled sinteze pro-angiogenih i pro-inflamatornih citokina, kao što su VEGF i faktor rasta fibroblasta (*eng. fibroblast growth factor-FGF*) (Kalluri R, Zeisberg M, 2006), a prisustvo ćelijskih mikrotubula je neophodno za njihovu migraciju u predeo rane (Rhee S, 2009; Yang H i sar., 2010).

Dijabetes melitus je povezan i sa poremećajem proliferacije endotelnih progenitornih stem ćelija iz koštane srži, koje su važne u procesima angiogeneze i zarastanja rana (Loomans CJ i sar., 2004; Tepper OM i sar., 2002). Naime, pokazano je da DM značajno menja signalne mehanizme aktivacije i proliferacije pomenutih ćelija i doprinosi njihovoj apoptozi direktnim menjanjem aktivnosti VEGF, matriksne metaloproteinaze (MMP) i endotelne azot-oksida sintetaze (*eng. Endothelial nitric oxide synthase-eNOS*), kao signalnih molekula od značaja za regrutaciju i migraciju endotelnih progenitorih ćelija u predeo rane (Liu ZJ, Velazquez OC, 2008; Gallagher KA i sar., 2007; Albiero M i sar., 2011).

Konačno, epigenetski mehanizmi, uključeni u kontroli genske ekspresije i sledstvenoj sintezi signalnih molekula, kao i regulisanju međućelijske komunikacije u toku zarastanja rane, mogu biti izmenjeni u stanjima DM (Ozdemir D, Feinberg MW, 2019). Sa tim u vezi, kombinovana *in vivo* i klinička studija Lin i sar., ukazala je na značajno povišen nivo serumskog miR-217, hipoksijom indukovano faktora-1alfa

(HIF-1 α) i VEGF-a kod DM pacijenta u odnosu na zdrave. Štaviše, rezultati ove studije su pokazali statistički značajno veći nivo miR-217, dok su nivoi HIF-1 α i VEGF-a bili smanjeni kod jedinki sa prisustvom DM ulcera noge, u poređenju sa DM i zdravim pacijentima i miševima. Konačno, nakon tretmana ulcerima stopala kod DM miševa sa inhibitorom miR-217, pronašli su da dolazi do smanjenja zone ulcera, kao i njegovog ubrzanog zarastanja, praćenog sa značajnim smanjenjem inflamatornih citokina (IL-1 β , TNF- α i IL-6), ali i sa povećanjem nivoa HIF-1 α i VEGFa. Rezultati ove studije ukazuju da inhibicija miR-217, kao post-translacionog regulatora genske ekspresije, može pozitivno uticati na HIF-1 α /VEGF signalni put i sledstveno poboljšati angiogenezu i inflamatorni odgovor u toku zarastanja DM ulcera stopala na modelu miša (Lin CJ i sar., 2019)

NAUČNA OSNOVA PROBLEMA

Kako su dosadašnja istraživanja ukazala na klinički značaj primene piježohirurgije sa aspekta biološki opravdanog i kvalitetnijeg zarastanja koštanog tkiva, od posebnog značaja je bilo utvrditi racionalne osnove za primenu minimalno invazivne hirurške metode i kod pacijenata sa smanjenim kapacitetom koštanog i mekotkivnog zarastanja, kao što su pacijenti sa DM 1 i 2. S tim u vezi, značaj ove doktorske disertacije ogleda se u činjenici da do sada nema podataka u literaturi o uticaju piježohirurgije na stepen promena transdukcionih signalnih mehanizama, kod pacijenata sa DM 1 i 2, kod kojih je već promenjen tkivni, ćelijski i molekularni odgovor u zarastanju mekog i koštanog tkiva.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu da do sada nema podataka o uticaju piježohirurgije na stepen promena nivoa signalnih molekula i transdukcionih signalnih mehanizama, kao i njihove povezanosti sa promenama na tkivnom nivou kod pacijenata sa DM, postavili smo sledeće ciljeve doktorske teze:

1. Ispitati i uporediti kliničke intraoperativne parametre (dužina trajanja intrvencije i osteotomije) u toku primene piježohirurgije u odnosu na standardan metod hirurškog vađenja impaktiranih umnjaka u donjoj vilici, kod zdravih i DM 1 pacijenata.
2. Ispitati i uporediti kliničke parametre postoperativnog toka (bol, otok i trizmus), nakon primene piježohirurgije u odnosu na standardan metod hirurškog vađenja impaktiranih umnjaka u donjoj vilici, kod zdravih i DM 1 pacijenata.
3. Ispitati i uporediti uticaj piježohirurgije u odnosu na standardnu hiruršku proceduru na ekspresiju miR-21 molekula, nivoa VEGF, IL-1 β proteina i aktivnost SOD enzima u uzorcima koštanog tkiva uzetim prilikom hirurškog vađenja impaktiranih umnjaka u donjoj vilici kod zdravih pacijenata.
4. Ispitati korelaciju između kliničkih parametara postoperativnog toka i ekspresije miR-21 molekula, nivoa VEGF, IL-1 β proteina i aktivnosti SOD enzima, nakon primene piježohirurgije i standardne hirurške procedure vađenja impaktiranih umnjaka u donjoj vilici, kod zdravih pacijenata.
5. Ispitati i uporediti kliničke intraoperativne parametre (dužina trajanja intrvencije, osteotomije i odontotomije) u toku komplikovanog vađenja višekorenih zuba, primenom piježohirurgije u odnosu na standardan metod, kod zdravih i DM 2 pacijenata.
6. Ispitati kliničke parametre zarastanja oralnohirurške rane (bol, izgled gingive ekstrakcione alveole, indeks zarastanja, rezidualni volumen

alveole i epitelizaciju), nakon komplikovanog vađenja višekorenih zuba, primenom pijezohirurgije u odnosu na standardan metod, kod zdravih pacijenata.

7. Ispitati kliničke parametre zarastanja oralnohirurške rane (bol, izgled gingive ekstrakcione alveole, indeks zarastanja, rezidualni volumen alveole i epitelizaciju), nakon komplikovanog vađenja višekorenih zuba, primenom pijezohirurgije u odnosu na standardan metod, kod DM 2 pacijenata.
8. Uporediti kliničke parametre zarastanja oralnohirurške rane (bol, izgled gingive ekstrakcione alveole, indeks zarastanja, rezidualni volumen alveole i epitelizaciju), nakon komplikovanog vađenja višekorenih zuba, primenom pijezohirurgije u odnosu na standardan metod, između zdravih i DM 2 pacijenata.
9. Ispitati i uporediti uticaj pijezohirurgije u odnosu na standardnu hiruršku proceduru na ekspresiju miR-21 molekula, nivoe VEGF, MMP-9, PTEN proteina i aktivnost SOD enzima u uzorcima koštanog tkiva uzetim prilikom komplikovanog vađenja višekorenih zuba kod zdravih i DM 2 pacijenata.

HIPOTEZA

Pijezohirurška ekstrakcija impaktiranih umnjaka u donjoj vilici kod zdravih pacijenata praćena je značajno manjim postoperativnim otokom, slabije izraženim postoperativnim trizmusom i slabijim intenzitetom postoperativnog bola u odnosu na izraženost ovih parametara postoperativnog toka posle standardne hirurške intervencije.

Pijezohirurške osteotomije kod zdravih pacijenata su praćene povećanom ekspresijom miR-21 i smanjenim nivoom VEGF proteina u alveolarnom koštanom tkivu tokom hirurške ekstrakcije impaktiranih umnjaka u donjoj vilici.

Kod DM 2 u odnosu na zdrave pacijente, kvalitet zarastanja postekstrakcionih rana višekorenih zuba u gornjoj vilici je značajno uspešniji nakon primene pijezohirurgije u odnosu na standardni metod komplikovane ekstrakcije.

Primena pijezohirurgije u toku komplikovanih ekstrakcija višekorenih zuba kod pacijenata sa DM 2 praćena je povećanom ekspresijom miR-21 i smanjenim nivoom VEGF proteina u alveolarnom koštanom tkivu.

MATERIJAL

I

METOD

ETIČKI STANDARD

Klinički deo istraživanja sproveden je na Klinici za Oralnu hirurgiju, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, dok su eksperimentalna istraživanja vršena na Institutu Stomatološkog fakulteta i na Institutu za nuklearne nauke "Vinča". Istraživanje je sprovedeno u periodu od juna 2016. do juna 2018. godine, uz dozvolu Etičkog komiteta (br. 36/9) Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Takođe, ova klinička studija je registrovana u međunarodnoj bazi kliničkih istraživanja ClinicalTrials.gov (NCT02942108). Svi ispitanici su bili informisani pismenim i usmenim putem o ciljevima i značaju istraživanja, hirurškoj intervenciji, kao i postoperativnom oporavku i eventualnim rizicima. Pre učestvovanja u ispitivanje, od svih uključenih ispitanika dobijen je informisani pristanak u pisanoj formi. Ispitanici su mogli da prekinu učešće u bilo kojoj fazi istraživanja, na sopstveni zahtev ili na zahtev lekara istraživača, ukoliko je utvrđeno da se nisu u potpunosti pridržavali protokola istraživanja. Klinička studija je urađena u skladu sa principima Helsinške deklaracije i po principima *Dobre kliničke prakse (ICH harmonized tripartite guidelines: Guideline for Good Clinical Practice. J Postgrad Med 2001;47:45-50)*

Ova doktorska disertacija je sprovedena u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod brojem OI175021, čiji je naziv „Kontrola bola i molekularni mehanizmi kao faktori regenerativne terapije u stomatologiji kod zdravih pacijenata i pacijenata sa diabetes melitusom“.

DIZAJN ISTRAŽIVANJA

Klinička studija, koja je predmet ove doktorske disertacije, sprovedena je iz dva dela.

U prvom delu istraživanja, na modelu ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka ispitivan je i upoređivan uticaj pijezohirurške i standardne metode na parametre postoperativnog toka i nivoa oslobađanja signalnih molekula u koštanom tkivu (ćelijski i molekularni nivoi analize) kod zdravih pacijenta. Ovaj deo istraživanja je sproveden kao prospektivna, randomizovana, kontrolisana, jednostruko slepa i ukrštena klinička studija.

Na osnovu osteotomske tehnike uklanjanja koštanog tkiva oko neizniklog umnjaka, u ovoj kliničkoj studiji, zdravi ispitanici su bili podeljeni u sledeće grupe:

1. Grupa – Pijezohirurška metoda –26 pacijenta
2. Grupa – Standardna metoda –26 pacijenta

U okviru prvog dela istraživanja, uključeno je bilo 5 pacijenata obolelih od dijabetes melitusa tip 1 (DM 1) sa simetrično impaktiranim donjim umnjacima indikovanim za hiruršku ekstrakciju primenom pijezohirurgije i standardne hirurgije.

Drugi dio kliničke studije se odnosio na ispitivanje uticaja pijezohirurške i standardne tehnike na zarastanje rana nakon komplikovanog vađenja višekorenih zuba u bočnim segmentima gornje vilice, kod zdravih i pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 (DM 2). Ova faza kliničkog istraživanja je dizajnirana kao prospektivna, randomizovana, kontrolisana, jednostruko slepa klinička studija. I u drugom delu studije, kvalitet zarastanja postekstrakcione rane, pored kliničkih parametara, praćen je i analizom promena ekspresije signalnih molekula na ćelijskom i molekularnom nivou.

Na osnovu hirurške tehnike u toku ekstrakcije zuba i u zavisnosti od prisustva DM 2 u ovom delu kliničke studije, ispitanici su bili podeljeni u sledeće grupe:

1. Grupa – **pacijenti sa DM 2**–32 pacijenta
Podgrupe: a) Pijezohirurška metoda (16 pacijenata)
b) Standardna metoda (16 pacijenata)
2. Grupa – **zdravi pacijenti**–32 pacijenta
Podgrupe: a) Pijezohirurška metoda (16 pacijenata)
b) Standardna metoda (16 pacijenata)

U oba dela kliničkog istraživanja, redosled primene odgovarajuće tehnike prilikom ekstrakcije određen je randomizacijom, odnosno slučajnim izborom tehnike izvlačenjem naziva iz zatvorene koverta (pijezohirurška tehnika ili standardna tehnika), uz pomoć lekara koji nije učestvovao u izvođenju istraživanja, sakupljanju i obradi podataka.

ISPITIVANI PACIJENTI I KRITERIJUMI ZA UKLJUČIVANJE I ISKLJUČIVANJE IZ STUDIJE

U okviru prvog dela kliničkog istraživanja uključeni su bili zdravi i pacijenti oboleli od DM 1, kod kojih je indikovana obostrana hirurška ekstrakcija simetrično impaktiranih donjih umnjaka. U drugom delu kliničkog istraživanja su uključeni zdravi i pacijenti oboleli od DM 2, kojima je indikovano vađenje višekorenih zuba u gornjoj vilici. Prema klasifikaciji Američkog Udruženja Anesteziologa (*American Society of Anesthesiologists-ASA*), zdravi pacijenti su pripadali ASA I kategoriji, dok su pacijenti sa DM 1 i DM 2, u odnosu na prisustvo makroangiopatskih i mikroangiopatskih sistemskih komplikacija uzrokovanim dijabetes melitusom, bili klasifikovani kao ASA II (bez sistemskih komplikacija) ili ASA III (sa prisutnim sistemskim komplikacijama).

Opšti kriterijumi za uključivanje pacijenata u prvi dio kliničkog istraživanja, odnosno ispitivanje uticaja pijezohirurške tehnike na parametre postoperativnog toka na modelu hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka, bili su: prisustvo donjih simetrično i vertikalno anguliranih trećih molara u Klasi C i pozicijama 1 i 2 (klasifikacija Pell i Gregory), kod zdravih i DM 1 pacijenata, oba pola, uzrasta od 18 do 35 godina (Pell GJ, Gregory BT, 1933). Težina hirurške ekstrakcije je bila standardizovana u cilju povećavanja verovatnoće sličnih hirurških trauma. Shodno tome, svi impaktirani umnjaci uključeni u studiju su zahtevali separaciju krunice i korenova imajući u obzir njihovu morfologiju i broj korenova. Indikacija za ovakav pristup postavljena je u toku preoperativne evaluacije ortopantomografskih snimaka, i u slučaju nedoumica u odnosu na morfologiju korenova, rađene su dodatne analize 3D snimaka.

Opšti kriterijumi za uključivanje pacijenata u drugi dio kliničkog istraživanja, odnosno ispitivanje uticaja pijezohirurške tehnike na zarastanje ekstrakcionih rana nakon komplikovanih vađenja višekorenih zuba bili su: prisustvo višekorenih zuba u gornjoj vilici indikovanih za ekstrakciju uz pomoć separacije krunice i korenova, kod zdravih i DM 2 pacijenata, oba pola, starosti od 18 do 65 godina, kod kojih je sprovedena preoperativna kauzalna terapija mekih i čvrstih zubnih naslaga i obrada parodontalnih džepova. Indikacija za ovakav pristup postavljena je na osnovu kliničkog pregleda i preoperativne evaluacije ortopantomografskih snimaka ispitanika.

Kriterijumi za isključivanje iz istraživanja bili su: zubi sa akutnom i hroničnom infekcijom, skorašnja terapija antiinflamatornim ili kortikosteroidnim lekovima, trudnice ili dojilje, pušači sa >10 cigareta dnevno, pacijenti alergični na lekove i hranu, kao i pacijenti koji se nisu pridžavali protokola hiruške procedure i kontrola. Pacijenti koji nisu želeli da učestvuju u kliničkoj studiji tokom randomizacije su bili isključeni iz istraživanja.

Dodatni kriterijumi za uključivanje ispitanika obolelih od DM 1 i DM 2 bili su: prisustvo kontrolisanog dijabetes melitusa, sa nivoom glikozilisanog hemoglobina $HbA1c \leq 8\%$, šta je potvrđeno na nalazima nadležnog endokrinologa.

Pored uobičajenih demografskih podataka koji su se odnosili na sve ispitanike (starost, pol) za DM 1 i DM 2 ispitanike dodatno su beleženi podaci o dužini trajanja DM, vrsti terapije (dijeta, oralni hipoglikemici, insulin), nivoima jutarnje glikemije, vrednostima glikozilisanog hemoglobina (HbA1c), dobijenih na osnovu anamnestičkih podataka i medicinskog kartona.

HIRURŠKA EKSTRAKCIJA DONJIH IMPAKTIRANIH UMNJAKA

Hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka su bile zakazane u dva odvojena termina sa razlikom od četiri nedelje između njih. Kod svih pacijenata je preoperativno ordiniran amoksicilina sa klavulonskom kiselinom 625mg (*Amoksiklav*[®], Tbl farmacevtska družba, Ljubljana, Slovenia) i ispranje usta sa 15 ml, 0,2% rastvorom hlorheksidina (*Curasept*[®] ADS 220 Curaden Health-Care s.r.l., Saronno, Italy) u trajanju od 1 minut neposredno pre početka hirurške procedure.

Intervencije su vršene u lokalnoj sprovodnoj anesteziji donjoviličnog živca, jezičnog živca i obraznog živca. Kao lokalni anestetik korišten je 2% lidokain-hidrochlorid sa adrenalinom 1:80,000 (*Lidokain 2 % - Adrenalin*[®], Galenika, Belgrade, Serbia). Sve operacije su vršene od strane istog oralnog hirurga i asistenta.

Hirurška intervencija ekstrakcije umnjaka se vršila odizanjem mukoperiostalnog režnja pune debljine sa bukalne strane. Režanj se formirao rezom od sredine bukolingvalnog promera distalne površine drugog molara, pružajući se distalno po vrhu alveolarnog grebena, s bukalnom inklinacijom prema prednjoj ivici ramusa

mandibule. Drugi rez se pravio sulkusno ka napred, do distalne površine drugog premolara.

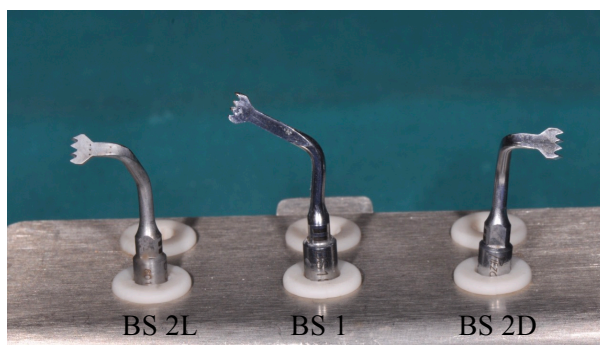
U piježohirurškoj grupi se koristio aparat *Piezotome Solo Led* (Satelec, France)(Slika 1) za odizanje mukoperiostalnog reznja, uklanjanje koštanog tkiva i stvaranja pristupa za separaciju krunice i korenova impaktiranog umnjaka. Za odizanje mukoperiostalnog reznja koristio se nastavak SL 5 (Slika 2) iz seta nastavka indikovanih u procedurama podizanja sluzokože poda maksilarnog sinusa (*sinus lift kit*). Sečenje kosti, da bi se pristupilo separaciji krunice i korenova, vršeno je nastavcima BS1, BS2L, BS2D (Slika 3) seta za koštanu hirurgiju (Slika 4)(Goyal M i sar., 2012). Frekvencija ultrazvučnih vibracija je bila podešena između 28 i 36 kHz, sa linijskom amplitudom mikrovibracije između 30 do 60 $\mu\text{m/s}$.



Slika 1. Piezotome Solo Led (Satelec, France)



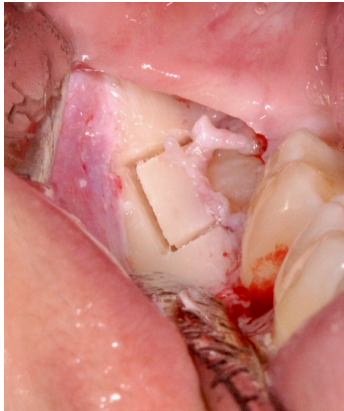
Slika 2. Piježohirurški nastavak SL 5



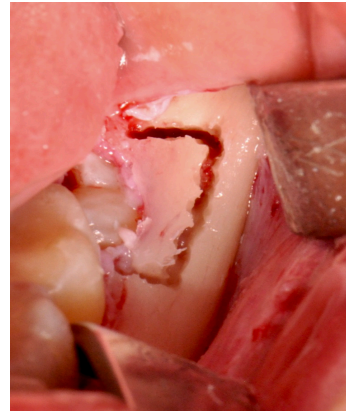
Slika 3. Piježohirurški nastavak BS1, BS2L, BS2D

U standardnoj metodi odizanje mukoperiostalnog reznja vršeno je raspatorijumom (*Molt's No. 9*), pažljivo i vodeći računa da tokom odizanja ne dodje do cepanja reznja. Za uklanjanje koštanog tkiva i stvaranja pristupa za separaciju krunice i korenova korišteno je karbidno okruglo svrdlo (*HP cavity round 022*,

Maillefer, Ballaigues, Switzerland) sa hirurškim nasadnikom pri obrtaju od 35,000 rpm (Slika 5). U toku rada svrdlom u koštanom i zubnom tkivu, hlađenje instrumenta je vršeno irigacijom sterilnim fiziološkim rastvorom.



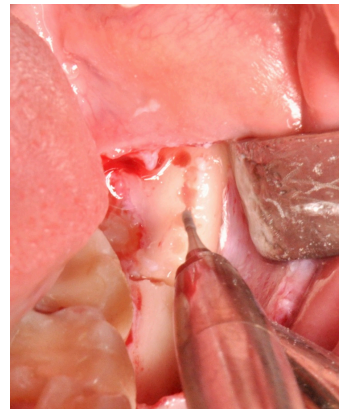
Slika 4 (a). Sečenje kosti i stvaranje pristupa za separaciju krunice i korenova piježohirurškim instrumentom



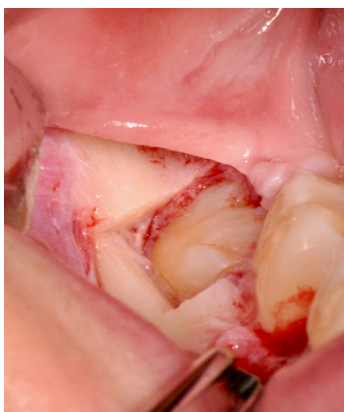
Slika 5 (a). Sečenje kosti i stvaranje pristupa za separaciju krunice i korenova standardnim pristupom



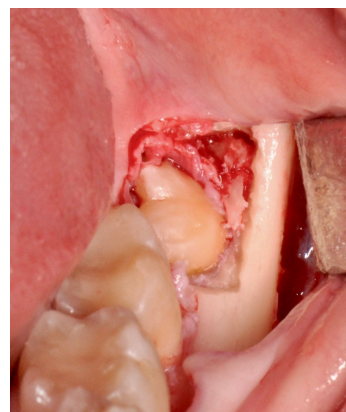
Slika 4 (b). Izgled piježohirurške osteotomske linije



Slika 5 (b). Izgled osteotomske linije formiran standardnim pristupom



Slika 4 (c). Izgled pristupa za separaciju krunice i korenova zuba formiranog piježohirurškom tehnikom



Slika 5 (c). Izgled pristupa za separaciju krunice i korenova zuba formiranog standardnom tehnikom

U obe grupe, separacija krunice i korenova vršena je okruglim karbidnim svrdlom (*HP cavity round 022, Maillefer, Ballaigues, Switzerland*) i hirurškim nasadnikom uz obilnu irigaciju sterilnim fiziološkim rastvorom, pri čemu se vodilo računa da se svrdlom ne dođe u kontakt sa koštanim tkivom, po prethodno opisanoj metodologiji (Sivolella S i sar., 2011; Goyal M i sar., 2012). Poluge i klešta su korišteni za dislokaciju i uklanjanje fragmenata krunice i korena zuba iz alveole.

Nakon vađenja zuba, ekstrakciona rana je bila isprana fiziološkim rastvorom, oštre koštane ivice zaravnjene turpijom za kost i rana ušivena koncem od svile (*Sofsilk® 4-0, Covidien llc, USA*). Svim pacijentima je ordiniran amoksicilin sa klavulonskom kiselinom 625mg (*Amoksiklav®*, Tbl farmacevtska družba, Ljubljana, Slovenia), tri puta dnevno u trajanju od tri dana (Rullo R i sar., 2013). Analgetik ibuprofen 400 mg (*Brufen 400mg, Galenika AD, Srbija*) je bio ordiniran, u slučaju potrebe, za kontrolu postoperativnog bola. Kortikosteroidni lekovi nisu bili ordinirani ni preoperativno, ni u postoperativnom periodu. Za kontrolu postoperativnog otoka koristila se fizikalna terapija primenom hladnih obloga spolja, na koži iznad operisane regije, 10 minuta u toku svakog sata, prvih šest sati nakon hirurške intervencije (Sortino F i sar., 2008). Pacijenti su bili savetovani da uzimaju prohlađenu i kašastu ishranu u prvih 24 sata nakon intervencije i da ispiraju usta sa 15 mL 0,12% rastvora hlorheksidina (*Curasept® ADS 212 Curaden Health-Care s.r.l., Saronno, Italy*), tri puta dnevno, u trajanju od jednog minuta, deset dana nakon hirurške intervencije (Mantovani i sar., 2014). Uklanjanje konaca vršeno je sedam dana nakon intervencije.

Klinički parametri:

a) Trajanje intervencije i osteotomije:

U toku hirurške intervencije beleženo je vreme koje protekne od početka incizije do postavljanja poslednjeg šava i prikazano je u minutima. Takođe, registrovano je vreme sečenja kosti piježohirurškom ili standardnom tehnikom prikazano u minutima.

b) Parametri postoperativnog toka:

Parametri postoperativnog toka koji su se pratili u ovom ispitivanju bili su: bol, trizmus i otok. Procena bola, trizmusa i otoka vršena je na kontrolnim pregledima prvog i trećeg dana nakon hirurške intervencije. Procenu bola registrovali su sami

pacijenti obučeni od strane odgovarajućeg lekara, na osnovu istraživačkog upitnika i protokola, dok je procenu trizmusa i otoka vršio nezavistan istraživač, koji nije bio upoznat sa vrstom primenjene hiruške tehnike.

BOL: Za procenu intenziteta bola korišćena je vizuelna analogna skala (*VAS*), označena linijom dužine 100mm (0 - nema bola, 100 - najjači mogući bol) (Barone i sar., 2010). Procena bola vršila se registrovanjem:

1. Učestalosti i intenziteta bola korišćenjem *VAS*,
2. Vremena pojave prvog bola nakon hirurške intervencije (Brajkovic i sar., 2014),
3. Vremena uzimanja prvog analgetika (ibuprofen 400mg) (Brajkovic i sar., 2014),
4. Ukupna količina primenjenog analgetika (ibuprofen 400mg) u postoperativnom periodu od 3 dana.

TRIZMUS: Procena trizmusa vršena je merenjem rastojanja između mezio-incizalnog ugla gornjeg i donjeg desnog centralnog sekutića u stanju maksimalno otvorenih usta (Slika 6)(Ustun Y i sar. 2003). Vrednost trizmusa je zapravo predstavljala razliku u interincizalnom rastojanju merenom preoperativno (bazična vrednost), sa vrednostima interincizalnog razmaka dobijenih prvog i trećeg dana.



Slika 6. Merenje interincizalnog razmaka između mezio-incizalnog ugla desnog gornjeg i donjeg centralnog sekutića.

OTOK: Procena otoka vršila se merenjem tri rastojanja između pet referentnih tačaka na licu pacijenta. To su: pogonion, spoljašnji ugao usana, spoljašnji ugao oka, tragus i ugao mandibule (Slika 7). Zbir rastojanja između referentnih tačaka izmeren preoperativno smatrao se bazičnom vrednošću za odgovarajuću stranu lica. Razlika u rastojanjima između referentnih tačaka merenih na postoperativnim kontrolama i bazične vrednosti predstavljala je vrednost otoka obraza za odgovarajući dan (Schultze-Mosgau S i sar., 1995).



Slika 7. Lokalizacija referentnih tačaka (1. Pogonion, 2. Spoljašnji ugao usana, 3. Spoljašnji ugao oka, 4. Tragus, 5. Ugao mandibule) korištenih u procenjivanju postoperativnog otoka.

c) Praćenje neželjenih efekata:

Kod svakog pacijenta beležena je moguća pojava neželjenih efekata i postoperativnih komplikacija, kao što su: nastanak alveolitisa, krvarenja i produženog zarastanja rane, bolne osetljivosti rane i pojave parestezije.

Laboratorijski parametri:

Kvantitativno određivanje ekspresije miR-21 molekula, nivoa VEGF-a, IL-1 β proteina i aktivnosti SOD enzima

U ovom delu istraživanju rađene su analize koštanih uzoraka uzetih primenom pijezohirurgije i standardne tehnike u toku hirurškog vađenja donjih impaktiranih umnjaka kod zdravih pacijenata. Određivanje ekspresije molekula miR-21 je urađeno na Institutu za nukelarne nauke "Vinča", Beograd, dok je kvantifikacija nivoa VEGF,

IL-1 β proteina i aktivnosti SOD enzima rađena na Institutu Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Uzimanje uzorka koštanog tkiva

Po završetku ekstrakcije zuba, osteotomija za uzimanje koštanih uzoraka vršena je standardnom tehnikom (hirurškim nasadnikom i okruglim (*HP cavity round 016, Maillefer, Ballaigues, Switzerland*) i fisurnim (*HP cavity cylinder 010, Maillefer, Ballaigues, Switzerland*) karbidnim svrdlima uz obilnu irigaciju sterilnim fiziološkim rastvorom) ili primenom pijezohirurgije (pijezohirurški nastavci BS1, BS2L, BS2D seta za koštanu hirurgiju). Iz svake operativne regije, uzet je koštani uzorak dimenzija 3x5x2 mm sa bukalne strane osteotomske pristupne linije, koja je bila u direktnom kontaktu sa hirurškom regijom, gde su prethodno rotirajuća svrdla i pijezohirurški nastavci korišteni u formiranju pristupa za separaciju krunice i korenova zuba (Slika 8 i 9). Uzeti koštani uzorci su bili sačinjeni od kompaktne kosti, imajući u vidu dimenzije uzetog uzorka, naročito njegovu debljinu od 2 mm, koja je odgovarala uobičajenoj debljini koštane kompakte u regiji donjih trećih molara (Fistarol F i sar., 2019). Koštani uzorci su uzeti otprilike 30 minuta nakon početka hirurške procedure, zatim trenutno smrznuti u tečnom azotu i čuvani na -80 ° C do početka laboratorijskih analiza (Kammerer PW i sar., 2012; Gulnihar Y i sar., 2015). Dimenzije koštanih uzoraka su odgovarale potrebnim količinama koštanog tkiva neophodnim za vršenje laboratorijskih analiza. Na uzorcima su kasnije ispitivani i poređeni nivoi ekspresije miR-21, koncentracije VEGF-a i IL-1 β , kao i aktivnosti SOD enzima u zavisnosti od primenjene hirurške tehnike.



Slika 8. Izgled uzorka koštanog tkiva uzetog primenom pijezohirurgije



Slika 9. Izgled uzorka koštanog tkiva uzetog primenom standardne tehnike

Postupak kvantifikacije VEGF-a, IL-1 β i SOD-a u uzorcima koštanog tkiva

Po odmrzavanju, koštani uzorci su isprani sa hladnim PBS/heparinom da bi se izbegla kontaminacija sa krvlju. Uzorci su zatim pripremani postupcima demineralizacije (1.2M HCL na 4°C, tokom noći), ekstrakcije (6M guanidin HCL+100 ml Tris+ 0.125M EDTA, na 4°C, 72 sata) i precipitacije (acetona) proteina. U ovako pripremljenim uzorcima nivoi VEGF i IL-1 β proteina su mereni imunosejskom (*eng. enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA*) metodom uz pomoć komercijalnih *ELISA* kitova (*Human VEGF Elisa kit, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA* and *Human Interleukin 1 Beta ELISA kit, Uscon Life Science, Inc. China*), dok je aktivnost SOD enzima (%) merena spektrofotometrijski, pomoću komercijalnih kitova (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) prema uputstvima proizvođača. Određivanje optičkih gustina rastvora rađeno je na aparatu Multiskan EX (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*).

Postupak kvantifikacije ekspresije miR-21 u uzorcima koštanog tkiva

a) Izolacija molekula RNK iz zamrznutih uzoraka koštanog tkiva

Iz uzoraka koštanog tkiva (prethodno zamrznutih u tečnom azotu) vršena je izolacija molekula RNK pomoću komercijalnog reagensa *miRNA Isolation Kit* (*Ambion, by Life Technologies, USA*).

Uzorci koštanog tkiva su prvobitno podvrgnuti denaturaciji proteina pomoću lizirajućeg bafera (*eng. Lysis Buffer*), a zatim tretirani kiselo-fenolnim hloroformom, a sa ciljem prečišćavanja i odstranjenja najvećeg dela DNK komponenti. Proces konačnog RNK prečišćavanja bio je usmeren na dobijanje malih nekodirajućih RNK molekula (RNK koji sadrže do 200 nukleotida). U tom cilju korišten je 100% etanol, kako bi se postigla koncentracija od 25% etanola u uzorcima. Nakon propuštanja etanol-lizirajuće smeše kroz stakleno-vlaknasti filter i uklanjanja velikih RNK molekula, dobijen je filtrat sa malim RNK molekulima. Po ponovnom uvećanju koncentracije etanola u filtratu do 55%, i filtracije na isti način, dobijena je RNK frakcija obogaćena malim RNK molekulima (≤ 200 nt).

Rastvor za ispiranje je pravljen tako što je dodato 21 mL 100 % etanola u miRNK *Wash Solution 1*. Dok je 40 mL 100% etanola dodato u miRNK *Wash Solution 2/3*.

Uzorci koštanog tkiva (20-50 mg težine) homogenizovani su pomoću tečnog azota. S obzirom na to da smo imali smrznuto koštano tkivo, nakon merenja i procene težine uzorka, korišćeno je 10 zapremina *Lysis/Binding Buffer*-a, prema preporukama proizvođača.

Nakon kompletne homogenizacije, dodato je 1/10 zapremine miRNA homogenisanog aditiva tkivnom lizatu i vorteksovano nekoliko puta, a potom inkubirano 10 minuta na ledu.

Zatim je dodat kiselo-fenolni hloroform iste zapremine kao i zapremina prvobitog lizata prije dodavanja miRNA homogenisanog aditiva. Nastala smeša je vorteksovana od 30 do 60 sekundi. Po centrifugiranju smeše (5 minuta sa maksimalnom brzinom od 10 000 rpm, na sobnoj temperaturi) dobijene su odvojene donja-roze, fenol-hloroformska faza, interfaza (tkz. organska faza u kojoj se nalaze proteini i DNK) i gornja, bezbojna odnosno vodena faza, koja sadrži molekule RNK.

Gornja vodena faza sa RNK sadržajem je pažljivo odlivena i prebačena u novu tubu. Uzorci su konačno isprani vodom bez enzima nukleaza (*eng. nuclease free*).

U prvoj fazi je dodato 1/3 zapremine 100% etanola vodenoj fazi dobijenoj nakon odstranjivanja organske komponente uzorka i zatim vorteksovano nekoliko puta. Za svaki pojedinačni uzorak je dodat filtracioni nastavak (*eng. filter cartridge*) na sakupljajuću tubu (*eng. collection tube*). Pipetirana je smeša lizat/etanola kroz

filtracioni nastavak, centrifugirana 15 sekundi (10 000 rpm) i sakupljen je filtrat.

U drugoj fazi dodato je 2/3 zapremina 100% etanola sakupljenom filtratu na sobnoj temperaturi i dobro pomešano. Za svaki uzorak je ponovo postavljen filtrirajući nastavak (*eng. filter cartridge*) na tubu za sakupljanje (*eng. collection tube*). Ponovo je pipetirana smeša filtrata/etanola kroz drugi filter, a potom centrifugiran 15 sekundi (10 000 rpm) da bi smeša prošla kroz filter.

Filter je prvo ispiran sa 700 µL miRNK *Wash Solution 1* i centrifugiran 5 – 10 sekundi, a zatim ponovo dva puta sa 500 µL *Wash Solution 2/3*. Po ispiranju, filtrirajući nastavak je vraćem na sakupljajuću tubu (*eng. collection tube*) i centrifugiran 1 minut sa ciljem eliminacije zaostale tečnosti sa filtera.

Na kraju, filtrirajući nastavak je primenjen na nove tube za sakupljanje (*eng. collection tube*), dodato je 100 µL vode bez nukleaza na centralni dio filtera, a potom centrifugirano 20-30 sekundi na maksimalnoj brzini da oporavi RNK molekule. Konačno, sakupljen je beličasti talog, eluat koji sadrži RNK i čuvan na -20 °C.

Kvantifikacija molekula RNK je vršena spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na 260 nm (A_{260}), pomoću BioSpec-nano aparata (*Shimadzu Corporation, Japan*). Svi analizirani uzorci su imali A_{260}/A_{280} odnos između 1.8 i 2.1, čime je potvrđen zadovoljavajući kvalitet ispitivanih uzoraka.

b) Lančana reakcija polimeraze kojoj prethodi reverzna transkripcija korišćenjem prajmera sa petljom (*Stem-Loop RT-qPCR*)

Kvantitativno određivanje ekspresije miR-21 je urađeno metodom lančane reakcije polimeraze u relanom vremenu (*eng. Real-time quantitative PCR, RT-qPCR*).

Za reakciju reverzne transkripcije, korišćeno je 10 ng od ukupne RNK, specifični prajmeri sa petljom za miR-21 (ID:000397) i male nukleolusne RNK RNU6B (ID:001093), (*TaqMan, Applied Biosystems, Foster City, California, USA*), inkubiranih 30 min na 16 °C, 30 min na 42 °C, 5 min na 85 °C (Tabela 1). Sve reakcije su pokrenute na Real Time PCR 7500 aparatu (*Applied Biosystems, Foster City, California, USA*), koristeći TaqMan miR-21 esej i RNU6B, kao endogenu kontrolu pri sledećem temperaturnom okviru: 95 °C u trajanju od 10 min, 95 °C u trajanju od 15 s, 60 °C u trajanju od 60 sek, praćenih sa 40 ciklusa. Nivo ekspresije miR-21 je bio

normalizovan u odnosu na endogenu kontrolu, RNU6B, i izračunat po komparativnom $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu, gde je ΔCt razlika u dobijenim prosečnim Ct (*eng. cycle threshold number*) vrednostima. Svi rezultati su bili izražavani u odnosu na kontrolne vrednosti.

Tabela 1. Temperaturni okviri reakcije reverzne transkripcije miR-21

Temperatura °C	Vreme (min)
16	30
42	30
85	5
4	∞

KOMPLIKOVANO VAĐENJE VIŠEKORENIH ZUBA

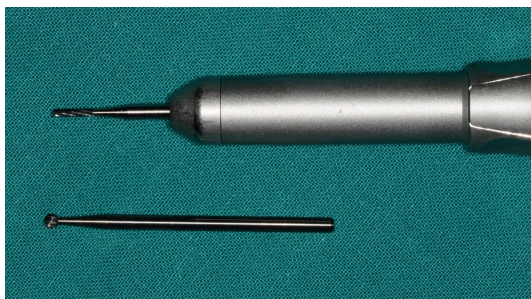
Kliničko istraživanje je sprovedeno na zdravim i DM 2 pacijentima kod kojih je indikovano komplikovano vađenje višekorenih zuba u bočnim segmentima gornje vilice u lokalnoj anesteziji.

Preoperativno pacijenti su isprali usta sa 15 ml, 0,2% rastvorom hlorheksidina (*Curasept[®] ADS 220 Curaden Health-Care s.r.l., Saronno, Italy*) u trajanju od 1 minut.

Kao lokalni anestetik korišten je 2% lidokain-hidrohlorid sa adrenalinom 1:80,000 (*Lidokain 2 % - Adrenalin[®], Galenika, Belgrade, Serbia*). Sve operacije su vršene od strane istog oralnog hirurga i asistenta.

U toku standardne metode ekstrakcije, separacija krunice i korenova, uklanjanje koštanog tkiva i preparacija retencionih mesta za aplikaciju poluga vršene su karbidnim okruglim svrdlom (*HP cavity round 022, Maillefer, Ballaigues, Switzerland*) sa hirurškim nasadnikom, na 35,000 rpm obrtaja. U toku rada svrdlom u koštanom i zubnom tkivu hlađenje instrumenta je vršeno sterilnim fiziološkim rastvorom. Uklanjanje koštanog tkiva intertadikularnog septuma, koje je korišteno za laboratorijske analize, vršeno je okruglim (*HP cavity round 016, Maillefer, Ballaigues,*

Switzerland) i fisurnim (*HP cavity cylinder 010, Maillefer, Ballaigues, Switzerland*) karbidnim borerom sa hirurškim nasadnikom uz obilnu irigaciju sterilnim fiziološkim rastvorom i kleštima za kost (Slika 10).



Slika 10. Okrugli i fisurni borer sa hirurškim nasadnikom korišteni prilikom standardnih ekstrakcija

U pijezohirurškoj grupi korišten je aparat *Piezotome Solo Led (Satelec, France)*. Separacija krunice i korenova zuba, odvajanje korenova od zidova alveole i preparacija retencionih mesta vršena je pijezohirurškim nastavcima (SL2, LC1, LC2 i *Ninja* nastavak) seta korištenih u ekstrakcijama zuba prema uputstvu proizvođača (Slika 11). Frekvencija ultrazvučnih vibracija je bila podešena između 28 i 36 kHz sa amplitudom mikrovibracije od 30 do 60 $\mu\text{m/s}$. Uklanjanje koštanog tkiva intertadikularnog septuma za laboratorijske analize vršeno je pijezohirurškim nastavkom BS1 iz seta za koštanu hirurgiju i kleštima za kost (Slika 12).



Slika 11. Pijezohirurški nastavci korišteni u procedurama komplikovanih vađenja zuba (a), pijezohirurški nastavci korišteni u proceduri širenja periodontalnog prostora (LC 1 i LC 2), sečenja periodontalnog ligamenta i zubnog tkiva (*Ninja*) (b)



Slika 12. Izgled BS 1 piježohirurškog nastavka iz seta za koštanu hirurgiju.

Po završetku separacije krunice i korenova zuba, luksacije korenova i njihovo uklanjanje iz alveole vršeno je pomoću poluga i klešta kod svih ispitanika. Postekstrakciona alveola je isprana fiziološkim rastvorom i oštre koštane ivice zaravnjene turpijom za kost.

Za kontrolu postoperativnog bola, u slučaju potrebe, pacijentima je ordiniran analgetik ibuprofen 400 mg (*Brufen 400mg, Galenika AD, Srbija*). Kortikosteroidni lekovi nisu bili ordinirani ni preoperativno, ni u postoperativnom periodu. Pacijentima je, za kontrolu postoperativnog otoka, savetovano da drže hladne obloge spolja, na koži, iznad operisane regije, 10 minuta u toku svakog sata, prvih šest sati nakon hirurške intervencije (Sortino F i sar., 2008). Takođe, preporučena im je prohladna i kašasta ishrana u prvih 24 sata i ispiranje usne duplje sa 15 mL 0,12 % rastvora hlorheksidina (*Curasept® ADS 212 Curaden Health-Care s.r.l., Saronno, Italy*), tri puta dnevno, u trajanju od jednog minuta, deset dana nakon hirurške intervencije (Mantovani E i sar., 2014).

Klinički parametri:

a) Trajanje intervencije, osteotomije i odontotomije:

U toku ekstrakcije zuba beleženi su parametri trajanja intervencije, koji obuhvataju ukupnu dužinu trajanja ekstrakcije, dužinu trajanja osteotomije i dužinu trajanja odontotomije, a bili su izraženi u minutima.

b) Parametari postoperativnog toka:

Parametri postoperativnog toka koji su se pratili u ovom delu ispitivanju bili su: bol, izgled gingive ekstrakcione alveole, indeks zarastanja, rezidualni volumen alveole

i epitelizacija ekstrakcionih alveola. Procenu bola registrovali su sami pacijenti na dan hirurške intervencije, obučeni od strane odgovarajućeg lekara, na osnovu istraživačkog upitnika i protokola. Procenu izgleda gingive, indeksa zarastanja, rezidualnog volumena i epitelizacije ekstrakcione alveole vršena je neposredno nakon ekstrakcije zuba i na kontrolnim pregledima trećeg, sedmog, četrnestog i dvadeset prvog dana. Istraživač, koji je vršio procenu kliničkih parametara zarastanja, nije bio upoznat sa vrstom primenjene hirurške tehnike u ekstrakcijama zuba.

BOL: Za procenu intenziteta bola koristila se vizuelna analna skala (*VAS*), označena linijom dužine 100mm (0 - nema bola, 100 - najjači mogući bol) (Barone A i sar., 2010). Procena bola vršena je registrovanjem:

1. Učestalosti i intenziteta bola korišćenjem *VAS*,
2. Vremena pojave prvog bola nakon hirurške intervencije (Brajković i sar., 2014),
3. Vremena uzimanja prvog analgetika (ibuprofen 400mg) (Brajković i sar., 2014)
4. Ukupna količina primenjenog analgetika (ibuprofen 400mg) prvog dana.

IZGLED GINGIVE EKSTRAKCIONE ALVEOLE: Procena izgleda vršena je primenom skale u odnosu na boju gingive, prisustvo edema i krvarenja (Sivolella S i sar., 2011):

1. Roze boja, bez edema
2. Crveno-roze boja, blago edematozna
3. Crvena, edematozna
4. Crvena, edematozna, blago krvari na dodir

INDEKS ZARASTANJA i REZIDUALNI VOLUMEN EKSTRAKCIONE ALVEOLE: Praćenje zarastanja ekstrakcione rane vršeno je pomoću indeksa zarastanja i rezidualnog volumena alveole na sledeći način:

Indeks zarastanja je procenjivan na osnovu izgleda boje gingive ekstrakcione alveole, boje i konzistencije zarastajućeg tkiva u ekstrakcionoj alveoli, kao i prisustva supuracije i krvarenja iz ekstrakcione alveole (Mozzati M i sar., 2013). Procena je vršena na sledeći način:

1. Boja tkiva:

1 = 100% površine gingive roze boje

2 = <50% površine gingive crvena, hiperemična, pokretna pri palpaciji

3 = >50% površine gingive crvena, hiperemična, pokretna pri palpaciji

2. Boja i konzistencija zarastajućeg tkiva:

1 = zrnasta, roze, u celosti popunjava alveolu

2 = meka, crvena

3 = fragilna, zelenkasta, sivkasta

3. Supuracija:

1 = odsutna

2 = odsutna, ali prisutna izražena količina naslaga na zidovima alveole

3 = izražena pri palpaciji

4. Krvarenje:

1 = odsutno

2 = indukovano palpacijom

3 = spontano

Rezidualni volumen alveole (*eng. Residual Socket Volume-RSV*) je određivan na osnovu matematičkog proračuna na sledeći način (Mozzati M i sar., 2013):

$$RSV = (BL \times MD \times DA) t / (BL \times MD \times DA) t-0$$

BL: Rastojanje između unutrašnjih ivica marginalne gingive sa bukalne i lingvalne strane ekstrakcione rane.

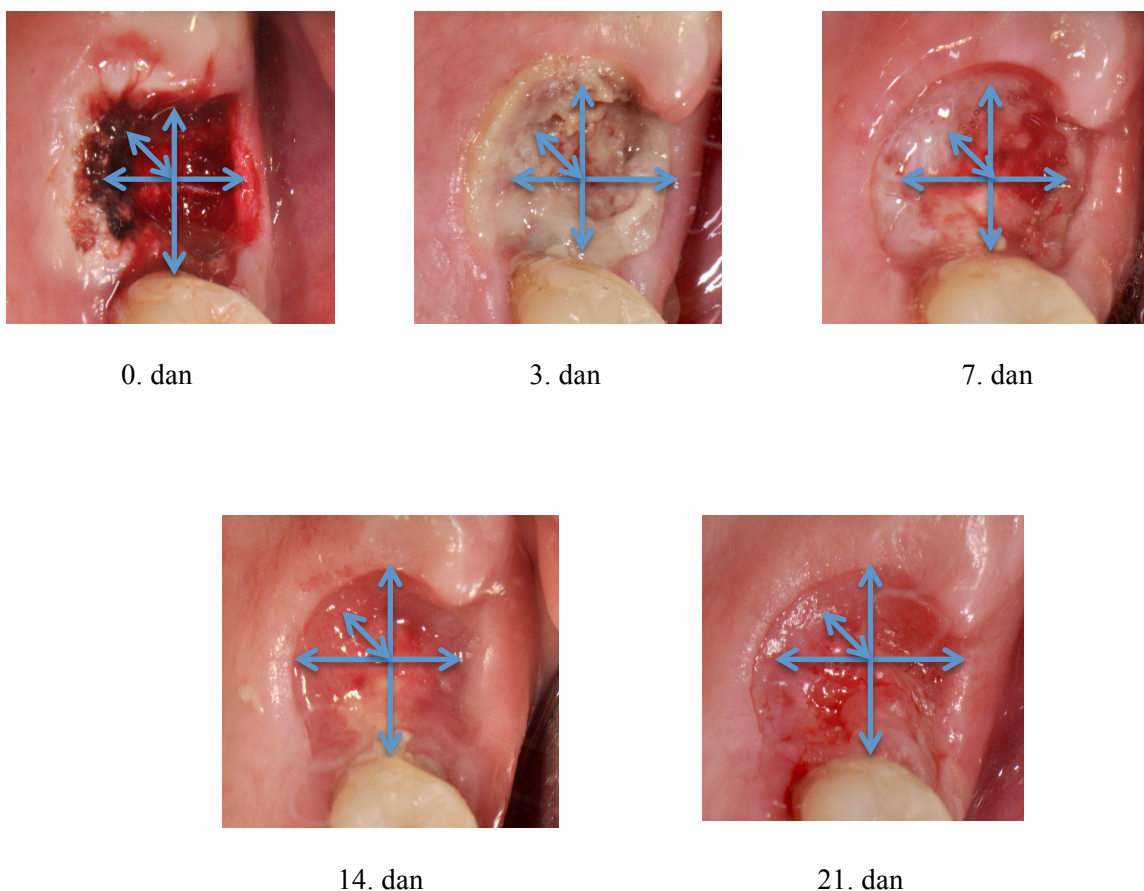
MD: Rastojanje između unutrašnjih ivica marginalne gingive sa mezijalne i distalne strane ekstrakcione rane.

DA: Dubine alveole merena od najniže tačke do linije koja spaja vrh marginalne gingive sa bukalne i oralne strane

t: kontrolni pregledi 3, 7, 14 i 21 dan

0: Vrednosti BL, MD, DA merenih nakon ekstrakcije (bazalna vrednost)

PROCENA EPITELIZACIJE EKSTRAKCIONE ALVEOLE: Procena epitelizacije vršena je merenjem buko-oralnog i mezio-distalnog rastojanja između unutrašnjih ivica marginalne gingive, kao i merenjem dubine alveole, od najniže njene tačke do linije koja spaja vrh marginalne gingive sa bukalne i oralne strane (Slika 13)(Mozzati M i sar., 2013). Stopa epitelizacije predstavljala je razliku vrednosti gore spomenutih rastojanja merenih neposredno nakon ekstrakcije sa rastojanjim merenim na kontrolnim pregledima (3, 7, 14, 21 dan) (Aronovich S i sar., 2010).



Slika 13. Procena epitelizacije: Mesta merenja buko-oralnog, mezio-distalnog rastojanja i dubine alveole (0, 3, 7, 14, 21 dana)

Praćenje neželjenih efekata:

Kod svakog pacijenta je registrovana moguća pojava neželjenih efekata i postoperativnih komplikacija, kao što su: nastanak alveolitisa, krvarenja i produženog zarastanja rane, bolne osetljivosti rane i pojavu parestezije.

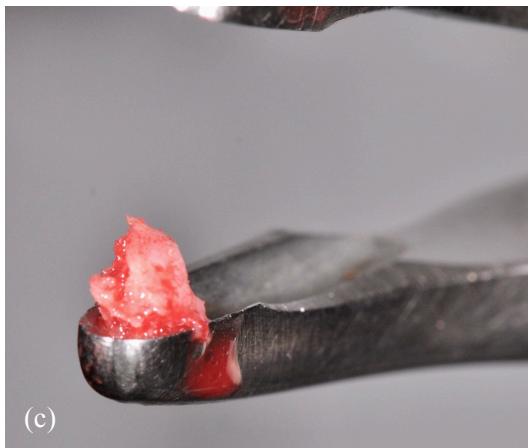
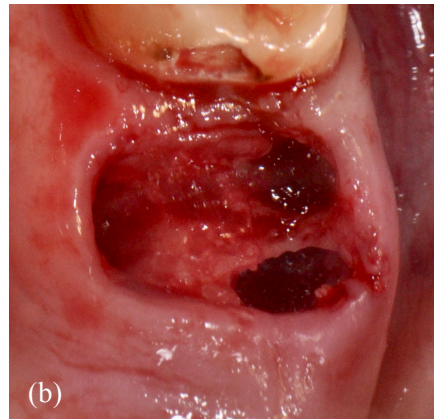
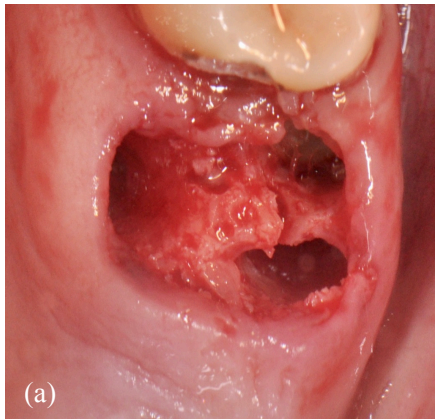
Laboratorijski parametri:

Kvantitativno određivanje ekspresije miR-21 molekula, nivoa VEGF, MMP-9, PTEN proteina i aktivnosti SOD enzima

U ovom delu istraživanja rađene su analize koštanih uzoraka uzetih primenom piježohirurgije i standardne tehnike u toku komplikovanog vađenja višekorenih zuba kod zdravih i DM 2 pacijenata. Određivanje ekspresije molekula miR-21 je urađeno na Institutu za nuklearne nauke "Vinča", Beograd, dok je kvantifikacija nivoa VEGF-a, MMP-9, PTEN-a i aktivnost SOD enzima rađena na Institutu Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Uzimanje uzorka koštanog tkiva:

Po zavšetku ekstrakcije, koštani uzorci interradikularnih septuma su uzeti primenom standardne tehnike (okruglim i fisurnim karbidnim) ili piježohirurgije (nastavci BS1, BS2L, BS2D seta za koštanu hirurgiju). U toku uzimanja koštanog tkiva primenom standardne tehnike, svrdla su hlađena obilnom količinom fiziološkog rastvora u toku rada. Koštano tkivo interradikularnog septuma (dimenzija 3x5x2 mm) je prethodno bilo u direktnom kontaktu sa regijom gde je vršena ekstrakcija zuba, koja je podrazumevala separaciju krunice i korenova zuba, kao i pravljenje retencionih mesta u koštanom tkivu za aplikaciju poluga uz pomoć piježohirurške ili standardne tehnike. Uzeti koštani uzorci su bili spongiozne građe, imajući u vidu regiju uzimanja i morfologiju koštanog tkiva interradikularnog septuma u gornjoj vilici (Slika 14) (Joudzbalys G, Kubilius M, 2013). Po uzimanju, uzorci su bili trenutno smrznuti u tečnom azotu i čuvani na -80 ° C do početka laboratorijskih analiza (Gulnihar i sar., 2013). Dimenzije koštanih uzoraka su odgovarale potrebnim količinama tkiva neophodnim za vršenje laboratorijskih analiza. Na uzorcima su ispitivani i poređeni nivoi ekspresije miR-21 molekula, koncentracije VEGF, MMP-9, PTEN proteina, kao i aktivnosti SOD enzima u zavisnosti od hirurške tehnike uzimanja i zdravstvenog statusa pacijenata.



Slika 14. Izgled ekstrakcione alveole nakon vađenja korenova zuba (a), izgled ekstrakcione alveole nakon uzimanja koštanog uzorka (b), izgled koštanog tkiva interdentalnog septuma uzet lijerovim kleštima za kost (c)

Postupak kvantifikacije VEGF-a, MMP-9 i PTEN-a, SOD-a u uzorcima koštanog tkiva

Po odmrzavanju, koštani uzorci su isprani sa hladnim PBS/heparinom da bi se izbegla kontaminacija sa krvlju. Uzorci su zatim pripremani postupcima demineralizacije (1.2M HCL na 4°C, tokom noći), ekstrakcije (6M guanidin HCL+100 ml Tris+ 0.125M EDTA, na 4°C, 72 sata) i precipitacije (acetom) proteina. U ovako pripremljenim uzorcima nivoi VEGF, MMP-9 i PTEN proteina su mereni imunesejskom *ELISA* metodom uz pomoć komercijalnih *ELISA* kitova (*Human VEGF Elisa kit, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Human MMP-9 Quantikine Elisa kit, R&D Systems®, Inc. Minneapolis, MN, USA; Humani Elisa kit for Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN), Cloud-Clone Corp, Katy, TX, USA*), dok je aktivnost SOD enzima (%) merena spektrofotometrijski, pomoću komercijalnog kita (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) prema uputstvima proizvođača.

Određivanje optičkih gustina rastvora rađeno je na aparatu Multiskan EX (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*).

Postupak kvantifikacije ekspresije miR-21 u uzorcima koštanog tkiva

Izolacija molekula RNK iz zamrznutih uzoraka koštanog tkiva i lančana reakcija polimeraze, kojoj prethodi reverzna transkripcija korišćenjem prajmera sa petljom (*Stem-Loop RT-qPCR*) za kvantitativno određivanje ekspresije miR-21, rađene su metodološki na isti način kao i u toku prvog dela istrživanja pomoću komercijalnog reagensa *miRNA Isolation Kit* (*Ambion, by Life Technologies, USA*).

STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

Statistička analiza prikupljenih podataka vršena je u SPSS programu, verzija 18 (SPSS, IBM Statistics, USA). Testiranje normalnosti distribucije kontinualnih podataka vršeno je pomoću *Kolmogorov-Smirnov* testa.

U prvom delu kliničkog istraživanja, od neparametarskih testova korišćeni su *Chi-square* test i *Wilcoxon Sign Rank* test, dok su podaci sa normalnom distribucijom, izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija, bili analizirani sa *Student t* testom. *Spearman* i *Pearson* test korelacije su korišćeni za ispitivanje povezanosti između kliničkih i laboratorijskih parametara, statistički značajnih između ispitivanih grupa.

U drugom delu istraživanja, statistička analiza parametara zarastanja ekstrakcionih rana nakon komplikovanih ekstrakcija zuba vršena je primenom *Mann Whitney U* testa za poređenja između grupa, dok su za poređenja unutar grupa korišćeni *Friedman* test (*post hoc* *Vilkokson* test) i *Mann Whitney U* test.

Minimalni nivo statističke značajnosti bio je podešen na $p \leq 0,05$.

Konačan broj ispitanika u toku kliničkog istraživanja definisan je na osnovu snage studije od najmanje 0,8 (80%) i greške 1. tipa i vrednosti od 0,05. Za proračun je korišćena pretpostavljena vrednost intenziteta postoperativnog bola izražena pomoću VAS, u različitim grupama. U prvom delu (efektna veličina 0,91; snaga 0,9943) bilo je potrebno uključiti 26 ispitanika sa prisutnim obostrano impaktiranim umnjacima. U drugom delu (efektna veličina 0,96; snaga 0,8080) minimalan ukupan broj zdravih i DM 2 pacijenata sa indikovanom ekstrakcijom višekorenog zuba u gornjoj vilici iznosio je 60 (po 15 u svakoj grupi). Izračunavanje veličine uzoraka u grupama izvedeno je primjenom *t-paired* test u prvom delu istraživanja, dok je *Wilcoxon-Mann-Whitney* test korišten u izračunavanju veličine uzorka drugog dela istraživanja u programskom paketu GPower 3.1.

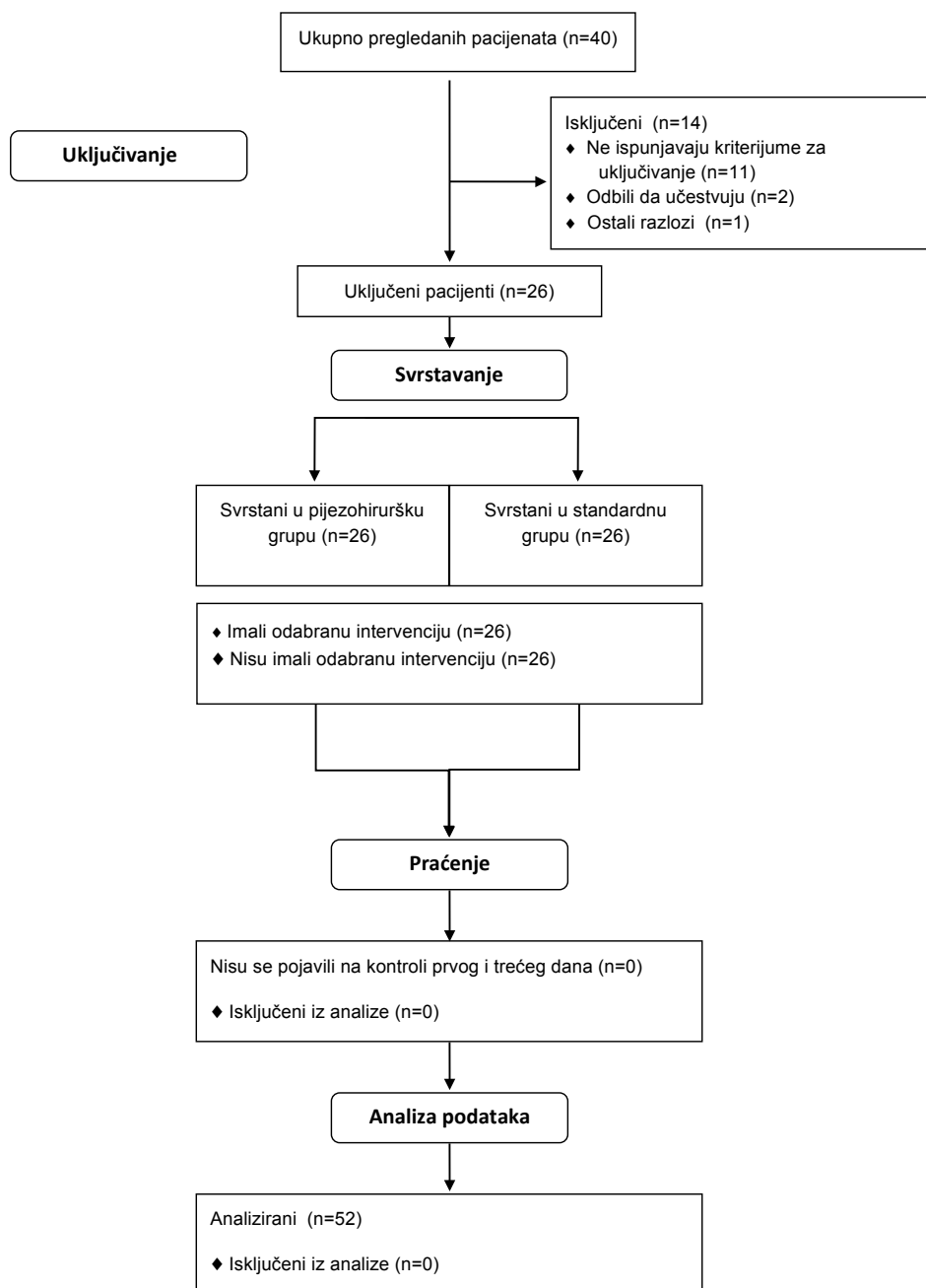
REZULTATI

I. Klinički parametri postoperativnog toka nakon hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka primenom pijezohirurgije i standardne hirurgije kod zdravih pacijenata

Studijski dijagram toka istraživanja, snaga studije, veličina uzorka, karakteristike ispitanika i trajanja intervencije

Dizajn sprovedene kliničke studije hirurškog vađenja donjih impaktiranih umnjaka primenom piježohirurgije i standardne hirurgije prikazan je na dijagramu toka istraživanja (Grafik 1.1). U odnosu na terapijski protokol, u ovom delu kliničkog istraživanja, formirane su dve grupe (zdravi ispitanici koji su tretirani piježohirurškom metodom i standardnom metodom u ukrštenom dizajnu). Imajući u vidu statističku analizu snage studije zasnovanu na preliminarmin rezultatima, kao i studiju Goyal i sar., koja je pokazala statistički značajno manju vrednost VAS-a (intenziteta bola) nakon primene piježohirurgije u odnosu na standardnu hirurgiju, potreban broj ispitanika sa obostrano impaktiranim umnjacima je iznosio 26 (Goyal M i sar., 2012). Na ovaj način umnjaci sa jedne strane su bili ekstrahovani primenom piježohirurgije, dok je standardan hirurški pristup bio korišten u ekstrakcijama na suprotnoj strani.

Kriterijumi za uključivanje i isključivanje su primenjeni na 40 ispitanika, od kojih je 26 (14 muškaraca i 12 žena) sa potpuno impaktiranim i simetrično postavljenim donjim trećim molarima indikovanim za hiruršku ekstrakciju u studiji ukrštenog dizajna, uključeno u proces randomizacije i svrstano ili u piježohiruršku ili standardnu grupu. Osnovne demografske karakteristike pacijenata su prikazane i analizirane u tabeli 1.1. Među ispitanicima obe grupe nije postojala statistički značajna razlika u godinama starosti, kao i distribuciji polova. Ukupno vreme trajanja hirurške intervencije, kao i vreme potrebno da se izvede osteotomija, bilo je statistički značajno duže nakon primene piježohirurgije u odnosu na standardnu tehniku (Tabela 1.1).



Grafik 1.1. Dijagram randomizacije pacijenata indikovanih za hirursku ekstrakciju donjih impaktiranih umnjaka primenom piježohirurgije i standardne hirurgije u studiji ukrštenog dizajna (CONSORT Statement 2010 Flow Diagram from Schulz KF, Altman Dg, Moher D, for the CONSORT Group (2010) CONSORT 2010 statement: Updated guidelines for parallel group randomized trials. J Pharmacol Pharmacother. doi: 10.4103 /0976-500X.72352).

Tabela 1.1. Demografske i osnovne kliničke karakteristike ispitivane populacije

Parametri			
(srednja vrednost \pm SD)			
N		26	
Starost	Muškarci	23,00 \pm 2,58	
	Žene	22,00 \pm 3,32	
	p	n.s.	
Pol, N	Muškarci	14	
	Žene	12	
	p	n.s.	
Hirurgija			
Trajanje intervencije (min)	Pijezo	Standardna	p
Ukupno trajanje	32,55 \pm 5,50	29,35 \pm 4,56	<0,05
Osteotomija	4,50 \pm 1,01	3,25 \pm 0,98	<0,001

N: broj učesnika po grupi; SD: standardna devijacija; n.s.: nema statističke značajnosti

Starost: *t-test*; Pol: χ^2 test; Trajanje intervencije: *t-test*

Parametri postoperativnog toka (bol, trizmus i otok)

Intenzitet bola, vreme javljanja prvog bola, vreme uzimanja prvog analgetika, kao i ukupan broj uzetih analgetika su prikazani u tabeli 1.2.

Intenzitet bola, registrovan vizuelnom analognom skalom (VAS), bio je statistički značajno manji prvog dana nakon intervencije u piježohirurškoj grupi u odnosu sa standardnu grupu. Poređenja intenziteta bola registrovanih prvog i trećeg dana unutar piježohirurške i standardne grupe nisu pokazala statistički značajnu razliku (Tabela 1.2).

Vreme javljanja prvog postoperativnog bola, kao i vreme uzimanja prvog analgetika, beleženog od strane ispitanika, bilo je statistički značajno kraće na strani gde je primenjena standardna tehnika pri hirurškoj ekstrakciji zuba. Statistički značajna razlika u broju uzetih analgetika, u prvih sedamdeset dva sata nakon hirurške intervencije, nije postojala između ispitivanih grupa (Tabela 1.2).

Tabela 1.2. Parametri bola nakon hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka, primenom pijezohirurgije i standardne hirurgije, kod zdravih pacijenata

Parametri, (srednja vrednost \pm SD)	Hirurgija			p
	Pijezo	Standardna		
N	26	26		
Intenzitet bola, VAS (mm)	1 dan 21,28 \pm 9,43	31,27 \pm 9,79		<0,01
	3 dan 23,92 \pm 13,73	26,04 \pm 16,05		n.s.
Vremenski okviri (min),				
Prvi postoperativni bol	175,89 \pm 64,70	131,52 \pm 37,90		<0,05
Prvi uzeti analgetik	279,44 \pm 155,04	193,61 \pm 83,44		<0,05
Broj analgetika, (Minimum-Maksimum)	1,42 \pm 1,42 (0-6)	1,84 \pm 1,64 (0-6)		n.s.

N: broj ispitanika po grupi; *VAS*: vizuelna analogna skala; *SD*: standardna devijacija; n.s.: nema statističke značajnosti; Intenzitet bola, Vremenski okviri: *t*-test; Broj analgetika: *Wilcoxon Sign Rank* test

Trizmus, prikazan kao razlika u interincizalnom razmaku pri maksimalno otvorenim ustima merenom preoperativno (bazična vrednost), u odnosu na prvi i treći dan, bio je značajno izraženiji nakon primene standardne hirurgije trećeg postoperativnog dana. Takođe, nakon primene standardne tehnike, postojalo je značajno povećanje u intenzitetu trizmusa trećeg u poređenju sa prvim postoperativnim danom, za razliku od pijezohirurške grupe, gde razlike nije bilo (Tabela 1.3).

Otok obraza je bio prisutan nakon primene obe hirurške tehnike, prvog i trećeg dana nakon operacije, bez statistički značajne razlike između grupa. Međutim, svi ispitanici su imali statistički značajno smanjenje otoka trećeg u odnosu na prvi postoperativni dan (Tabela 1.3).

Svi ispitanici su imali uspešno zarastanje hirurških rana i nije zabeleženo prisustvo bilo kakvih komplikacije u obe grupe.

Tabela 1.3. Trizmus i otok nakon hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka, primenom pijezohirurgije i standardne hirurgije, kod zdravih pacijenata

Parametri, (srednja vrednost ± SD)	Hirurgija			p
	Pijezo	Standardna		
N	26	26		
Trizmus (mm),	1 dan	8,98 ± 5,71	10,68 ± 5,94	n.s.
	3 dan	10,01 ± 4,91	14,74 ± 6,67	<0,001
	p	n.s.	<0,001	
Otok (mm)	1 dan	10,00 ± 3,24	10,89 ± 4,34	n.s.
	3 dan	6,28 ± 2,93	7,67 ± 5,78	n.s.
	p	<0,001	<0,001	

N: broj ispitanika; SD: standardna devijacija; n.s.: nema statističke značajnosti;

Trizmus, Otok: *t*-test

II. Laboratorijski parametri mereni u uzorcima koštanog tkiva uzetim u toku hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka primenom piježohirurgije i standardne hirurgije kod zdravih pacijenata

Ekspresija miR-21 molekula, nivoi VEGF, IL-1 β proteina i aktivnosti SOD enzima u uzorcima koštanog tkiva

Ekspresija molekula miR-21 u uzorcima koštanog tkiva je bila statistički značajno veća nakon primene piježohirurgije u poređenju sa standardnom hirurgijom (Tabela 2.1).

Sa druge strane, koncentracija oslobođenog VEGF proteina u koštanom tkivu je bila značajno smanjena nakon primene piježohirurgije u poređenju sa standardnom grupom (Tabela 2.1).

Nivo IL-1 β proteina je bio povišen u uzorcima koštanog tkiva uzetim primenom piježohirurgije u odnosu na uzorke gde je korištena standardna tehnika, ali bez statistički značajne razlike između grupa. (Tabela 2.1).

Spektrofotometrijska analiza je pokazala da nije bilo statistički značajne razlike u aktivnosti SOD enzima, kao glavnog enzima antioksidativne zaštite, između standardne i piježohirurgije (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Relativna ekspresija molekula miR-21, nivoi VEGF i IL-1 β proteina, aktivnost enzima SOD u alveolarnoj kosti nakon primene piježohirurgije i standardne hirurgije u toku hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka kod zdravih pacijenata.

Parametri (srednja vrednost \pm SD)	Hirurgija		p
	Piježo	Standardna	
N	26	26	
miR-21	4,62 \pm 0,57	3,45 \pm 0,99	<0,01
VEGF (pg/ml)	23,35 \pm 6,94	33,22 \pm 8,63	<0,01
IL-1 β (pg/ml)	26,51 \pm 5,34	17,72 \pm 3,13	n.s.
SOD (%)	41,46 \pm 24,07	43,89 \pm 23,81	n.s.

SD: Standardna Devijacija; *N*: broj ispitanika; *miR-21*: mikroRNK-21; *VEGF*: faktor rasta vaskularnog endotela; *IL-1 β* : Interleukin-1 β ; *SOD*-superoksid-dizmutaza; *n.s.*: nema statističke značajnosti; miR-21, VEGF, IL-1 β , SOD: *t*-test

III. Ispitivanje koeficijenta korelacije između kliničkih i laboratorijskih parametara nakon hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka primenom piježohirurgije i standardne hirurgije kod zdravih pacijenata

Jačina povezanosti, ispitivana Pirsonovom i Spirmanovom korelacionom analizom, urađena je između kliničkih (postoperativnog bola i trizmusa) i molekularnih parametara (ekspresija molekula miR-21 i nivoa VEGF proteina), koji su se pokazali kao značajno međusobno različiti u toku dosadašnje analize rezultata u ovom istraživanju.

Statistički značajna pozitivna korelacija je pronađena između ekspresije molekula miR-21 i vremena javljanja prvog bola u obe ispitivane grupe, odnosno nakon primene i piježohirurgije i standardne hirurgije (Tabela 3.1).

Sa druge strane, statistički značajna negativna korelacija je pronađena između ekspresije miR-21 i trizmusa trećeg dana, kao i ekspresije miR-21 i intenziteta bola (VAS) prvog dana nakon intervencije, ali samo u grupi gde je korišćena standardna hirurgija (Tabela 3.1).

Imajući u vidu mogućnost različite ekspresije molekula miR-21 između polova (muškaraca i žena), kao i uslovljenost oslobađanja ovog molekula uzrastom ispitanika, primenom analize varijanse u dva pravca nije utvrđen statistički značajan uticaj pola i starosti ispitanika na razlike u ekspresiji miR-21 (pol: $F=0,14$; $p=0,71$, starost: $F=0,37$; $p=0,54$) između piježohirurške i standardne grupe (Tabela 3.2).

Značajna korelacija nije pronađena između nivoa VEGF-a u uzorcima koštanog tkiva i parametara postoperativnog bola i trizmusa (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Koeficijent korelacije između ekspresije molekula miR-21, nivoa VEGF proteina u koštanom tkivu i parametara postoperativnog toka, nakon hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka primenom pijezohirurgije i standardne hirurgije kod zdravih pacijenata

Parametri	Trismus (3. dan)		VAS (1. dan)		Vreme pojave prvog bola	
	Hirurgija		Hirurgija		Hirurgija	
	Pijezo	Standardna	Pijezo	Standardna	Pijezo	Standardna
miR-21	-0,03	-0,44*	0,20	-0,65**	0,45*	0,57**
VEGF	-0,13	-0,11	0,14	0,05	- 0,14	0,27

VAS: vizuelna analogna skala; *miR-21*: mikroRNK-21; *VEGF*: faktor rasta vaskularnog endotela; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Koeficijenti korelacije – *Spearman*, *Pearson* test

Table 3.2. Uticaj razlike u polovima i starosti ispitanika na ekspresiju molekula miR-21 u koštanom tkivu nakon primene pijezohirurgije i standardne tehnike u toku hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka kod zdravih pacijenata

Parametri	miR-21 (srednja vrednost± SD)	
	Hirurgija	
Pol	Pijezo	Standardna
N	26	26
Muškarci	4,64 ± 0,56**	3,51 ± 0,97
Žene	4,58 ± 0,58**	3,38 ± 1,04
Starost		
18-22 godina	4,73 ± 0,54**	3,41 ± 0,83
23-31 godina	4,42 ± 0,54**	3,43 ± 1,11

N: broj ispitanika po grupi; *miR-21*: mikroRNK-21; *SD*: standardna devijacija

**p<0,01 pijezohirurgija prema standardnoj hirurgiji;

Pol, Starost, Ekspresija miR-21: *Two-way ANOVA* (ponovljena merenja);

IV. Klinički parametri postoperativnog toka nakon hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka primenom pijezohirurgije i standardne hirurgije kod DM 1 pacijenata

Veličina uzorka, karakteristike ispitanika, trajanja intervencije i parametri postoperativnog toka (bol, trizmus i otok)

Ukupan broj DM 1 pacijenata, kod kojih je indikovano hirurško vađenje simetrično impaktiranih umnjaka u donjoj vilici, primenom pijezohirurgije i standardne hirurgije, iznosio je 5 pacijenata.

Osnovne demografske karakteristike ispitivane DM 1 populacije, kao i vrednosti dužine trajanja intervencije i osteotomije prikazane su u tabeli 4.1. Među ispitanicima obolelim od DM 1 nije postojala značajnost u starosti, distribuciji među polovima, kao ni u dužini trajanja oboljenja, vrednostima jutarnje glikemije i glikozilisanog hemoglobina (Tabela 4.1).

Pijezohirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka kod DM 1 pacijenata su bile praćene statistički značajno dužim trajanjem intervencije i osteotomije, u odnosu na standardni hirurški pristup (Tabela 4.1).

Imajući u vidu broj pacijenata u ispitivanim grupama, tabelarni prikaz dobijenih rezultata parametara postoperativnog toka (bol, trizmus, otok) nije rađen zbog nevalidnosti statističkih značajnosti.

Intenzitet bola (1. dan, pijezo: $27,69 \pm 8,93$; standardna: $30,09 \pm 18,25$; 3. dan, pijezo: $34,43 \pm 12,33$; standardna: $35,30 \pm 14,25$), vremena javljanja prvog postoperativnog bola (pijezo: $215,89 \pm 90,48$; standardna: $198,77 \pm 105,10$), i uzimanja analgetika (pijezo: $282,89 \pm 120,21$; standardna: $268,59 \pm 149,55$), ukupan broj uzetih analgetika (pijezo: $1,71 \pm 0,48$; standardna: $1,33 \pm 0,53$) su bili približno jednaki nakon primene pijezohirurgije u odnosu na standardnu hirurgiju u grupi DM 1 pacijenata. Takođe, razlike u intenzitetu trizmusa (1. dan, pijezo: $11,55 \pm 5,77$; standardna: $13,21 \pm 7,99$; 3. dan, pijezo: $15,28 \pm 8,20$; standardna: $13,77 \pm 8,25$) i otoka (1. dan, pijezo: $11,10 \pm 5,20$; standardna: $12,03 \pm 8,31$; 3. dan, pijezo: $7,89 \pm 6,50$; standardna: $7,20 \pm 7,51$) nisu postojale između primenjenih hirurških tehnika u DM 1 ispitivanoj populaciji pacijenata.

Tabela 4.1. Demografske karakteristike DM 1 pacijenata i trajanja intervencije

Parametri (srednja vrednost \pm SD)		5	
N		5	
Starost	Muškarci	21,00 \pm 3,25	
	Žene	23,15 \pm 2,58	
	p	n.s.	
Pol	Muškarci	3	
	Žene	2	
	p	n.s.	
Dužina trajanja (god)		11,55 \pm 9,59	
HbA1c (medijan, %)		7,1	
Jutarnja glikemija (mmol/l)		8,15 \pm 4,25	
Hirurgija			
Trajanje intervencije (min)	Pijezo	Standardna	p
Ukupno trajanje	29,45 \pm 7,09	25,89 \pm 8,59	<0,05
Osteotomija	5,20 \pm 2,01	3,55 \pm 1,70	<0,001

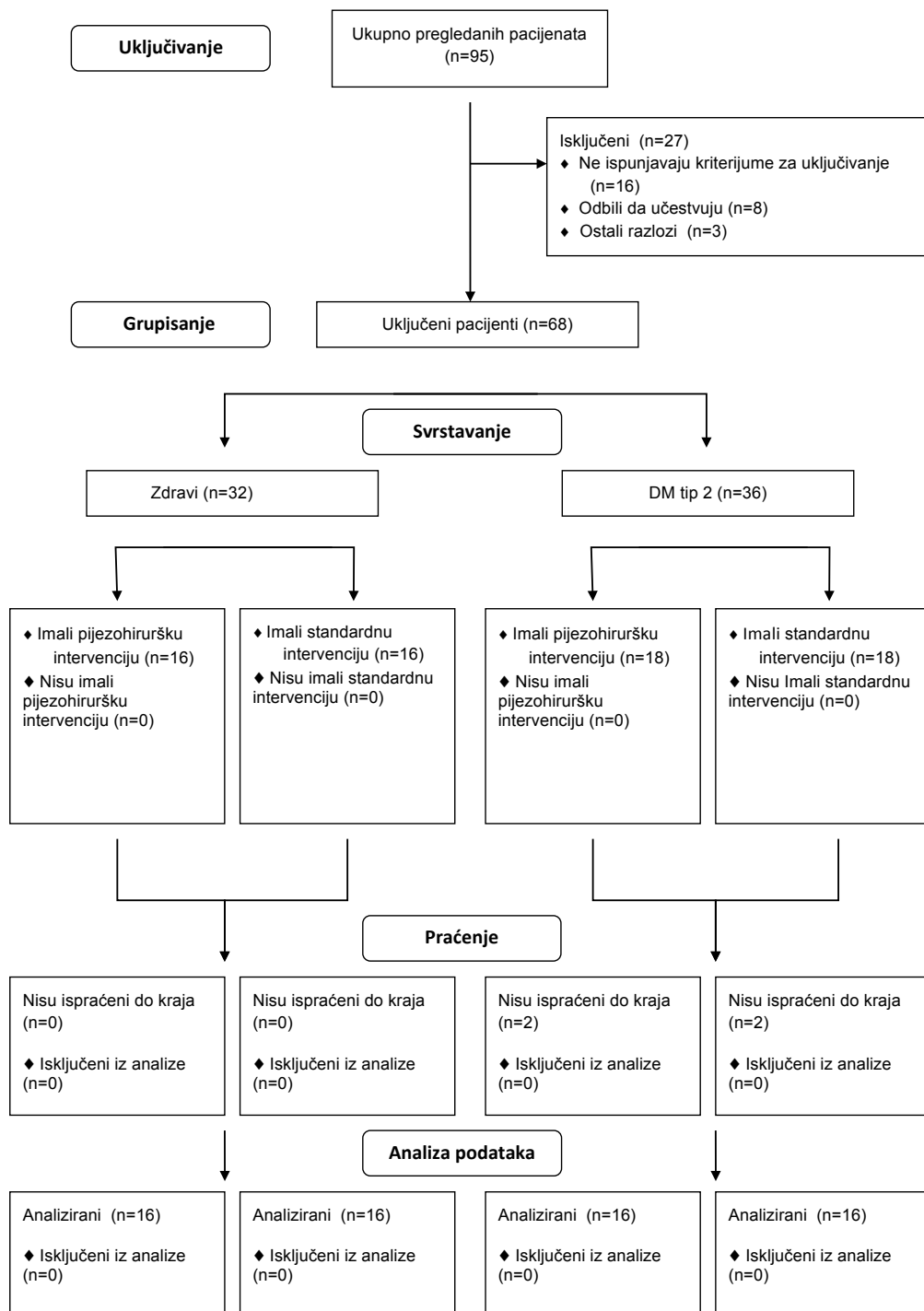
N: broj učesnika po grupi; SD: standardna devijacija; n.s.: nema statističke značajnosti; Starost: t-test; Pol: χ^2 test; Dužina trajanja: *Mann-Whitney* test; HbA1c: *Mann-Whitney* test; Jutarnja glikemija: t-test; Trajanje intervencije: t-test

V. Klinički parametri postoperativnog toka i zarastanja rana nakon komplikovane ekstrakcije višekorenih zuba primenom pijezohirurgije i standardne hirurgije kod zdravih i DM 2 pacijenata

Studijski dijagram toka istraživanja, snaga studije i veličina uzorka

Dizajn sprovedene kliničke studije koja se odnosila na praćenje parametara zarastanja oralnohirurških rana nakon komplikovanog vađenja zuba u gornjoj vilici primenom piježohirurgije i standardne hirurgije, kod zdravih i DM 2 ispitanika, prikazani su u dijagramu toka istraživanja (Grafik 5.1). U odnosu na terapijski protokol i zdravstveni status pacijenata, formirane su 4 grupe (zdravi i DM 2 pacijenti, kod kojih su korišćene piježohirurške i standardne procedure). U nama dostupnoj literaturi (Gangwani KD i sar., 2018) registrovane su višestruko niže vrednosti intenziteta bola, merenog sa VAS kod sistemski zdravih ispitanika tokom primene piezohirurgije u odnosu na standardnu hiruršku tehniku. Dosadašnja klinička iskustva kao i naša radna hipoteza ukazuju da bi se slični rezultati mogli dobiti i kod DM 2 pacijenata. Na osnovu ovih informacija, ali i preliminarnih rezultata ove studije, izračunata snaga studije je pokazala da je minimalan ukupan broj ispitanika 60 (po 15 u svakoj grupi).

Kriterijumi za uključivanje i isključivanje iz studije su primenjeni na 95 ispitanika, od kojih je 68 uključeno u proces randomizacije i svrstano u grupu zdravih (n=32) i DM 2 (n=36). U grupi DM 2, 4 ispitanika su isključena iz istraživanja, pa je konačan broj analiziranih ispitanika kojima je urađeno komplikovano vađenje zuba primenom piježohirurgije i standardne hirurgije bio 32 po grupi, odnosno po 16 ispitanika u okviru svake podgrupe (Grafik 5.1).



Grafik 5.1. Dijagram randomizacije zdravih i DM 2 pacijenata kod kojih je indicirana ekstrakcija višekorenih zuba u gornjoj vilici primenom piježohirurgije ili standardne hirurgije u studiji paralelnog dizajna (CONSORT Statement 2010 Flow Diagram from Schulz KF, Altman Dg, Moher D, for the CONSORT Group (2010) CONSORT 2010 statement: Updated guidelines for parallel group randomized trials. J Pharmacol Pharmacother. doi: 10.4103 /0976-500X.72352).

Demografske i osnovne kliničke karakteristike ispitivane populacije

Demografske karakteristike ispitanika su prikazane i analizirane u tabeli 5.1. U grupi zdravih, kao i u DM 2, nije postojala statistički značajna razlika u godinama starosti, telesnoj težini i distribuciji polova među ispitanicima tretiranim pijezohirurgijom i standardnom hirurgijom.

Statistički značajna razlika u godinama starosti je uočena između zdravih i DM 2 ispitanika, pri čemu su stariji ispitanici pripadali grupi DM 2. Među ispitanicima obolelim od DM 2 nije postojala razlika u dužini trajanja DM, terapiji koju su koristili u lečenju DM, kao i vrednostima jutarnje glikemije između pijezo i standardne podgrupe (Tabela 5.2). Takođe, u DM 2 grupi je postojala uravnotežena distribucija ASA II i ASA III statusa među pacijentima koji su tretirani pijezohirurgijom i standardnom hirurgijom (Tabela 5.2).

Vreme potrebno da se izvede osteotomija i odontotomija u toku ekstrakcija je bilo statistički značajno duže u toku primene pijezohirurgije u odnosu na standardnu tehniku u grupi zdravih i DM 2 ispitanika. Takođe, ukupna dužina trajanja komplikovanih ekstrakcija je bila statistički značajno veća nakon primene pijezohirurgije, ali samo u grupi DM 2 ispitanika. Sa druge strane, u grupi zdravih pacijenata nije bila prisutna statistički značajna razlika u dužini trajanja intervencija primenom pijezohirurgije i standardne hirurgije. Analizom parametara trajanja pojedinih faza komplikovanih ekstrakcija unutar pijezohirurške i standardne podgrupe između zdravih i DM 2 ispitanika, pronađeno je znatno duže trajanje pijezohirurške osteotomije u grupi DM 2 u odnosu na zdrave (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Demografske i osnovne kliničke karakteristike ispitivane populacije

Parametri (srednja vrednost \pm SD)	Hirurgija	Ispitanici		p
		Zdravi	DM 2	
N muškaraca/N žena	Pijezo	8/8	9/7	n.s.
	Standardna	7/9	8/8	n.s.
	p	n.s.	n.s.	
Starost (god)	Pijezo	44,25 \pm 10,79	51,38 \pm 8,28	<0,05
	Standardna	43,69 \pm 11,19	52,44 \pm 10,42	<0,05
	p	n.s.	n.s.	
Težina (kg)	Pijezo	65,69 \pm 4,22	70,56 \pm 8,89	n.s.
	Standardna	68,00 \pm 5,12	68,69 \pm 6,68	n.s.
	p	n.s.	n.s.	
Ukupno trajanje (min)	Pijezo	9,26 \pm 4,19	9,77 \pm 2,48	n.s.
	Standardna	9,02 \pm 2,70	7,65 \pm 2,12	n.s.
	p	n.s.	<0,05	
Trajanje osteotomije (min)	Pijezo	2,90 \pm 1,54	4,24 \pm 2,27	<0,05
	Standardna	1,68 \pm 1,94	2,02 \pm 1,35	n.s.
	p	<0,01	<0,01	
Trajanje odontotomije (min)	Pijezo	2,23 \pm 1,68	2,88 \pm 2,21	n.s.
	Standardna	1,31 \pm 1,04	1,66 \pm 1,05	n.s.
	p	<0,05	<0,05	

DM 2: dijabetes melitus tip 2; SD: standardna devijacija; N: broj ispitanika; n.s.: nema statističke značajnosti;

Starost, Težina: *t*-test; Pol: χ^2 test; Ukupno trajanje, Trajanje osteotomije, Trajanje odontotomije: *Mann-Whitney* test

Tabela 5.2. Osnovne karakteristike DM 2 ispitanika

Parametri (srednja vrednost \pm SD)	Hirurgija		P
	Pijezo	Standardna	
N	16	16	n.s.
Dužina trajanja (god)	11,44 \pm 9,59	9,69 \pm 5,16	n.s.
Terapija (N(%))			
Insulin	5 (31,3)	7 (43)	n.s.
Oralni hipoglikemici	11 (68,7)	9 (57)	n.s.
Dijeta	0	0	
HbA1c (medijana, %)	7,1	7,1	n.s.
Jutarnja glikemija (mmol/l)	8,56 \pm 1,96	10,06 \pm 2,59	n.s.
N (%) ASA II / N (%) ASA III	10 (62,5)/6 (37,5)	9 (56,2)/7 (43,8)	n.s.

N: broj ispitanika; *SD*: standardna devijacija; *HbA1c*: glikozilisani hemoglobin; n.s.: nema statističke značajnosti; Dužina trajanja: *Mann-Whitney* test; Terapija: χ^2 test, HbA1c: *Mann-Whitney* test; Jutarnja glikemija: *t*-test; N ASA II/ N ASA III: χ^2 test

Parametri evaluacije postoperativnog bola

Evaluacija postoperativnog bola vršena je merenjem intenziteta bola, vremena javljanja prvog postoperativnog bola, vremena uzimanja prvog postoperativnog analgetika, kao i ukupnog broja uzetih analgetika u toku prvih 24 sata (Tabela 5.3).

Intenzitet bola, procenjivan sa vizuelnom analognom skalom (VAS), bio je značajno manji nakon primene piježohirurgije u odnosu na standardnu tehniku u grupi zdravih, kao i u grupi DM 2 ispitanika. Poređenjem intenziteta bola unutar piježohirurške i standardne podgrupe, nije uočena statistička značajnost između zdravih i DM 2 ispitanika (Tabela 5.3).

Komparativnom analizom vremena koje protekne od završetka intervencije do javljanja prvog postoperativnog bola uočeno je njegovo značajno kasnije javljanje nakon primene piježohirurgije, u odnosu na standardnu tehniku u grupi zdravih i u grupi DM 2 ispitanika. Takođe, vreme uzimanja prvog postoperativnog analgetika je bilo značajno produženo nakon primene piježohirurgije, u odnosu na standardnu hirurģiju u grupi zdravih ispitanika. Sa sruge strane, u DM 2 grupi, nije postojala značajna razlika u vremenu uzimanja prvog analgetika nakon primene ispitivanih hirurških tehnika (Tabela 5.3).

Broj ispitanika u DM 2 grupi koji je osetio bol u prvih 24 sata nakon hirurģke intervencije je bio statistički značajno veći u odnosu na broj pacijenata koji su osetili bol u grupi zdravih, nakon primene i piježohirurgije i standardne hirurģije (Grafikon 5.2). Unutar grupe zdravih pacijenata, kao i pacijenata sa DM 2, nije bilo razlike u broju ispitanika koji su osetili bol bez obzira na primenjenu tehniku ekstrakcije zuba.

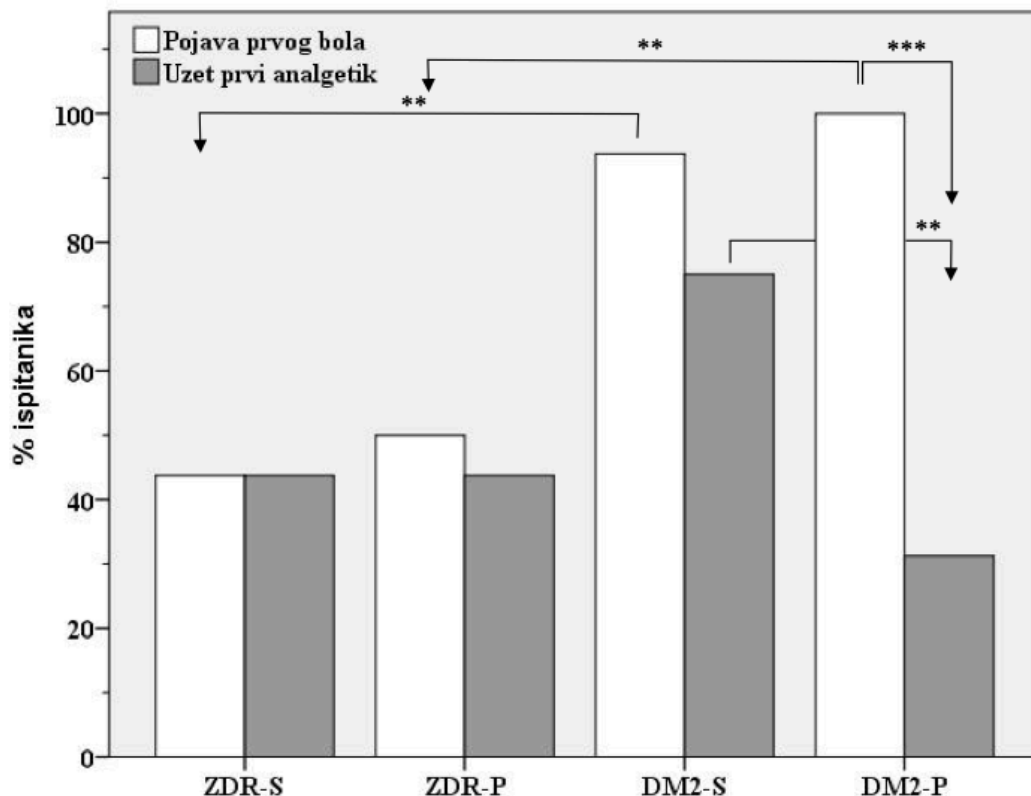
Statistički značajna razlika registrovana je između DM 2 pacijenata, kod kojih je značajno manji broj pacijenata uzeo analgetik, nakon primene piježohirurgije u odnosu na primenjenu standardnu tehniku. Sa druge strane, ova razlika nije postojala kod zdravih pacijenata (Grafikon 5.2).

Poređenjem broja pacijenata koji su osetili bol sa brojem pacijenata koji su uzeli analgetik nakon hirurģkih intervencija, pronađeno je da u grupi DM 2 ispitanika nakon primene piježohirurgije je postojao značajno manji broj pacijenata koji su uzeli analgetik u odnosu na broj pacijenta koji su osetili bol, dok nakon primene standardne hirurģije ova značajnost nije uočena (Grafikon 5.2).

Tabela 5.3. Parametri evaluacije bola nakon komplikovanog vađenja višekorenih zuba u gornjoj vilici, primenom piježohirurgije i standardne hirurgije, kod zdravih i DM 2 pacijenata

Parametri (srednja vrednost \pm SD)	Hirurgija	Ispitanici		p
		Zdravi	DM 2	
Intenzitet bola VAS (mm) N	Piježo	13,69 \pm 16,93 16/16	18,44 \pm 8,65 16/16	n.s.
	Standardna	29,19 \pm 19,31 16/16	29,13 \pm 14,07 16/16	n.s.
	p	<0,05	<0,05	
Prvi postoperativni bol (min) N	Piježo	238,21 \pm 80,52 8/16	231,77 \pm 61,74 16/16	n.s.
	Standardna	142,62 \pm 77,48 7/16	168,53 \pm 91,83 15/16	n.s.
	p	<0,05	<0,05	
Prvi uzeti analgetik (min) N	Piježo	271,76 \pm 76,33 7/16	261,48 \pm 94,86 5/16	n.s.
	Standardna	188,57 \pm 155,88 7/16	233,13 \pm 148,81 12/16	n.s.
	p	<0,05	n.s.	
Broj uzetih analgetika	Piježo	1,71 \pm 0,48	1,75 \pm 0,50	n.s.
	Standardna	1,57 \pm 0,53	1,33 \pm 0,49	n.s.
	p	n.s.	n.s.	

DM 2: dijabetes melitus tip 2; SD: standardna devijacija; VAS: vizuelna analogna skala; N: broj ispitanika; n.s.: nema statističke značajnosti; Intenzitet bola, Prvi postoperativni bol, Prvi uzeti analgetik, Broj uzetih analgetika: *Mann-Whitney test*



Grafik 5.2. Prikaz odnosa u broju ispitanika koji su osutili bol i uzeli prvi analgetik nakon komplikovanog vađenja višekorenih zuba u gornjoj vilici, primenom pijezohirurgije i standardne hirurgije, kod zdravih i DM 2 pacijenata.

ZDR-S: Zdravi-Standardna hirurgija, *ZDR-P*: Zdravi-Pijezohirurgija, *DM2-S*: Dijabetes melitus tip 2-Standardna hirurgija, *DM2-P*: Dijabetes melitus tip 2-Pijezohirurgija; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ u odnosu na odgovarajući parametar (χ^2 test)

Izgled gingive ekstrakcione alveole u toku procesa zarastanja

Izgled gingive ekstrakcione alveole procenjivan je primenom skale sa 4 ocene, pri čemu je na osnovu kliničkog izgleda, ocena 1 označavala roze boju gingive, bez edema, dok je ocena 4 ukazivala na crvenu, edematoznu gingivu koja blago krvari na sondiranje.

Poređenjem izgleda gingive postekstrakcione alveole, pronađeno je da su ocenjivane vrednosti neposredno nakon hirurške intervencije, bile statistički značajno manje nakon primene pijezohirurgije u odnosu na standardnu ekstrakciju u grupi zdravih, kao i u grupi DM 2 ispitanika (Tabela 5.4). Takođe, statistički značajno manje ocene su bile prisutne i sedmog postoperativnog dana u DM 2 grupi nakon

primene piježohirurgije, dok u grupi zdravih pacijenata nije postojala razlika između ispitivanih tehnika (Tabela 5.4). Poređenjem vrednosti ocenjenog izgleda gingive nakon primene ispitivanih hirurških metoda kod zdravih u odnosu na DM 2, dobijena je značajno manja vrednost u grupi zdravih nakon primene standardne tehnike sedmog postoperativnog dana u odnosu primenjenu standardnu tehniku kod DM 2 ispitanika (Tabela 5.4).

Daljom analizom promena u vrednostima izgleda gingive tokom procesa zarastanja (0, 3, 7, 14, 21 dana), prikazano grafički, pronađene maksimalne ocenjivane vrednosti nakon primene standardne hirurgije bile su nultog dana i kod zdravih i kod DM 2 ispitanika, dok su maksimalne vrednosti u piježohirurškim podgrupama bile prisute trećeg postoperativnog dana (Grafikon 5.3). U prva tri postoperativna dana, bilo je prisutno značajno povećanje ocenjivane vrednosti nakon primene piježohirurške tehnike i kod zdravih i kod DM 2 pacijenata. Sa druge strane, nakon primene standardne hirurgije, zabeleženo je smanjenje vrednosti u skali za procenu izgleda trećeg dana u odnosu na nulti dan, ali bez statističke značajnosti.

Poređenjem izgleda gingive alveola u zarastanju, sedmog u odnosu na treći postoperativni dan, dobijeno je statistički značajno smanjenje vrednosti skale nakon primene piježohirurgije u grupi zdravih i DM 2 ispitanika, sa najintenzivnijim smanjenjem kod DM 2–piježohirurgije, za razliku od primene standardne hirurgije, gde nije bilo statistički značajne razlike (Grafikon 5.3). Poređenjem četrnaestog, u odnosu na sedmi postoperativni dan, registrovano je statistički značajno smanjenje ocenjivanih vrednosti u svim grupama, osim u grupi DM 2 ispitanika tretiranih piježohirurgijom. Štaviše, i sedmog i četrnaestog dana u grupi DM 2 pacijenata tretiranih piježohirurgijom, bile su prisutne najmanje ocenjivane vrednosti u skalama za procenu izgleda gingive, u poređenju sa ostalim ispitivanim grupama sedmog i četrnestog dana (Tabela 5.4).

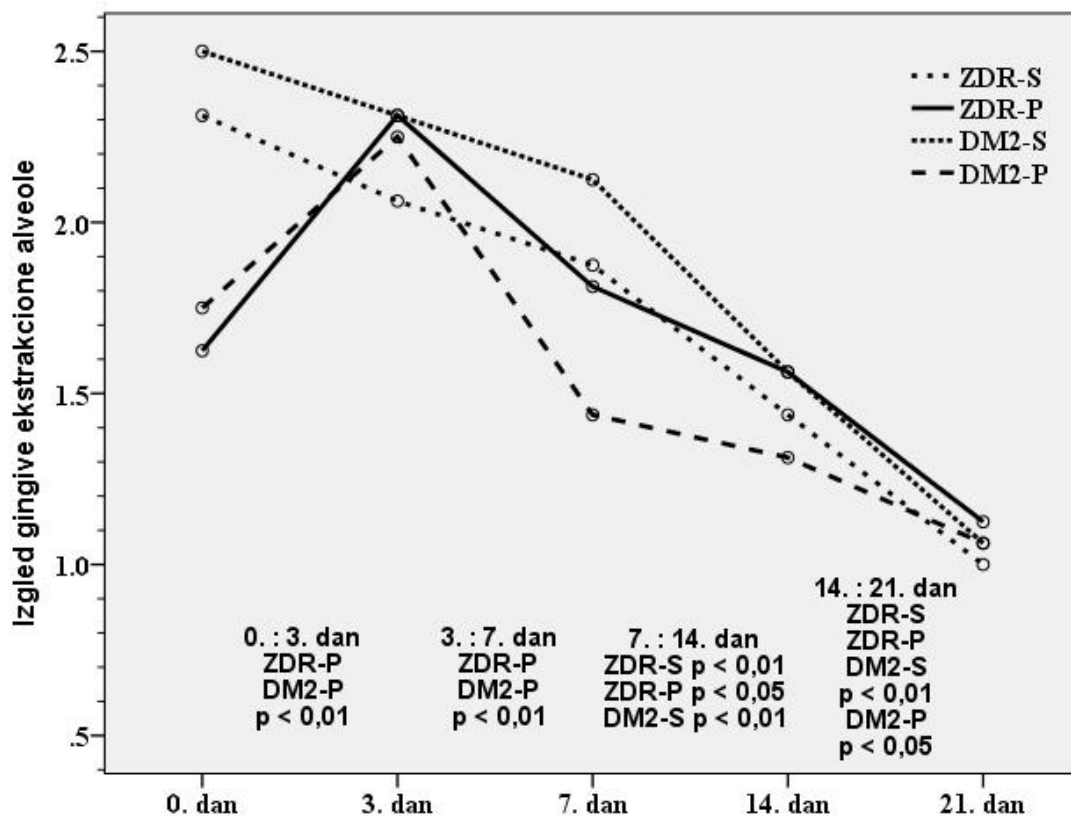
Dvadeset prvog dana u odnosu na četrnesti dan pronađeno je značajno smanjenje vrednosti ocena u svim ispitivanim grupama i podgrupama (Grafikon 5.3). Takođe, dvadeset prvog dana vrednosti izgleda gingive su bile približno iste u svim ispitivanim grupama (Tabela 5.4).

Tabela 5.4. Klinički izgled gingive ekstrakcione alveole u toku zarastanja, nakon komplikovanog vađenja višekorenih zuba u gornjoj vilici, primenom pijezohirurgije i standardne hirurgije, kod zdravih i DM 2 pacijenata

Postoperativni dan	Hirurgija	Ispitanici		p
		Zdravi	DM 2	
0	Pijezo	1,62 ± 0,72	1,75 ± 0,45	n.s.
	Standardna	2,31 ± 0,70	2,50 ± 0,51	n.s.
	p	<0,05	<0,001	
3	Pijezo	2,31 ± 0,60	2,25 ± 0,45	n.s.
	Standardna	2,06 ± 0,57	2,31 ± 0,48	n.s.
	p	n.s.	n.s.	
7	Pijezo	1,81 ± 0,54	1,44 ± 0,51	n.s.
	Standardna	1,88 ± 0,34	2,13 ± 0,34	<0,05
	p	n.s.	<0,001	
14	Pijezo	1,56 ± 0,51	1,31 ± 0,48	n.s.
	Standardna	1,25 ± 0,45	1,56 ± 0,63	n.s.
	p	n.s.	n.s.	
21	Pijezo	1,13 ± 0,34	1,06 ± 0,25	n.s.
	Standardna	1,00 ± 0,00	1,06 ± 0,25	n.s.
	p	n.s.	n.s.	

DM 2: dijabetes melitus tip 2; n.s.:nema statistički značajne razlike;

Klinički izgled gingive postekstrakcione alveole: *Mann-Whitney* test



Grafikon 5.3. Promene u izgledu gingive ekstrakcione alveole posmatranom neposredno nakon hirurške intervencije, kao i na kontrolnim pregledma 3, 7, 14, 21 dana nakon komplikovanih ekstrakcija zuba, primenom piježohirurgije i standardne hirurgije, kod zdravih i DM 2 pacijenata.

ZDR-S: Zdravi-Standardna hirurgija, ZDR-P: Zdravi-Piježohirurgija, DM2-S: Dijabetes melitus tip 2-Standardna hirurgija, DM2-P: Dijabetes melitus tip 2-Piježohirurgija;

Poređenja vrednosti izgleda gingive ekstrakcione alveole (0. : 3. dan; 3. : 7. dan; 7. : 14. dan; 14. : 21. dan): *Friedman test (post hoc Wilcoxon Sign Rank test)*

Indeks zarastanja i rezidualni volumen postekstrakcione alveole

Vrednosti indeksa zarastanja i rezidualnog volumena postekstrakcionih alveola, nakon primene piježohirurgije i standardne hirurgije, kod zdravih i DM 2 pacijenata, prikazani su u tabelama 5.5 i 5.6. Imajući u vidu da indeks zarastanja predstavlja zbir procena kliničkog izgleda, ocenjivanog brojevima 1, 2 i 3, četiri parametra evaluacije zarastanja ekstrakcione alveole, dobijene vrednosti od 4 idu u prilog potpunom zarastanju, dok vrednosti 12 ukazuju na otežano zarastanje.

Analizom vrednosti indeksa zarastanja, merenom neposredno nakon intervencije i na kontrolnim pregledima, pronađeno je da vrednosti indeksa zarastanja dostižu svoj maksimalni nivo trećeg postoperativnog dana, a zatim dolazi do njihovog smanjivanja. Najmanje i približno podjednake vrednosti ovog indeksa su registrovane dvadeset prvog postoperativnog dana (Tabela. 5.5).

Poređenjem vrednosti indeksa zarastanja, pronađene su značajno manje vrednosti indeksa neposredno nakon hirurške intervencije u piježohirurškoj podgrupi u odnosu na standardnu hirurgiju, kod zdravih i DM 2 ispitanika, dok na kontrolnim pregledima 3, 7, 14, 21 dana nije postojala razlika između ispitivanih grupa i podgrupa u vrednostima indeksa zarastanja (Tabela 5.5).

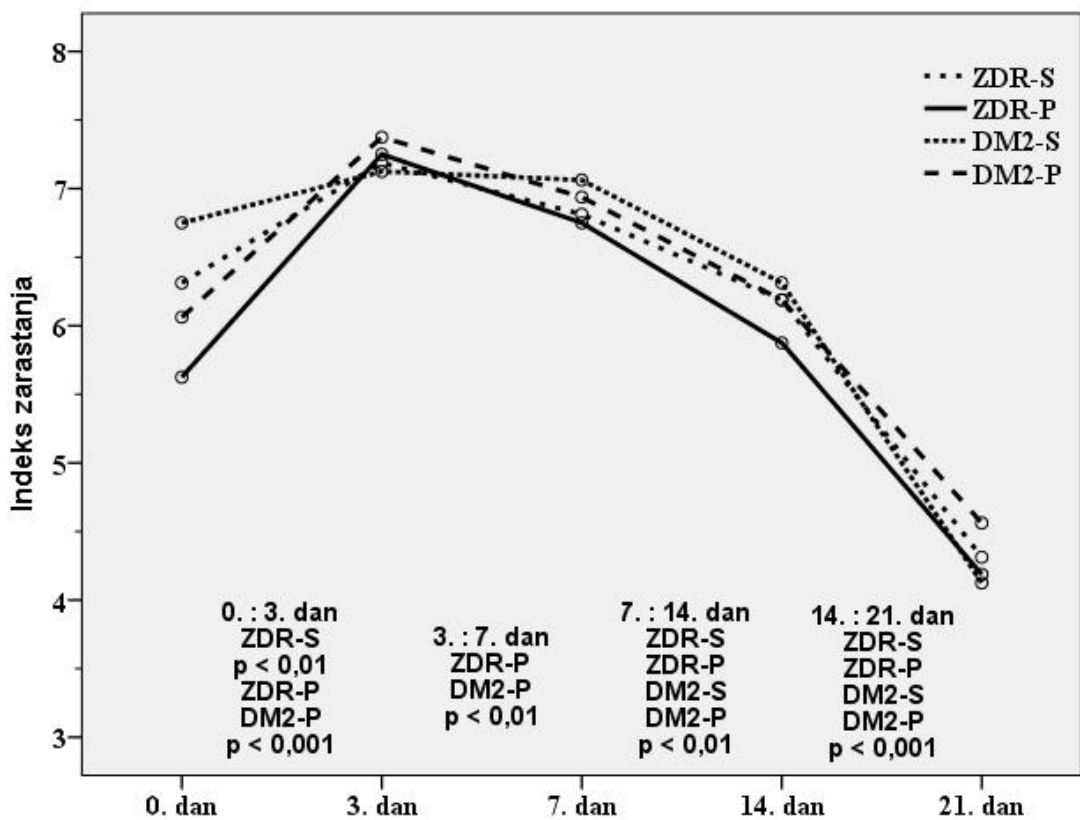
Analizom promena u indeksu zarastanja unutar piježohirurške i standardne podgrupe kod zdravih i DM 2 ispitanika, pronađeno je da trećeg u odnosu na nulti dan dolazi do statistički značajnog povećanja vrednosti indeksa u svim grupama, osim u grupi DM 2 pacijenata tretiranih standardnom hirurgijom (Grafikon 5.4). Štaviše, u grupi DM 2 pacijenata neposredno nakon hirurške ekstrakcije registrovane su najveće vrednosti ovog indeksa u odnosu na ostale ispitivane grupe (Tabela 5.5). Sedmog u odnosu na treći postoperativni dan dolazi do statistički značajnog smanjenja vrednosti indeksa u grupama zdravih i DM 2 ispitanika tretiranih piježohirurgijom (Grafikon 5.4). Sa druge strane, nakon primene standardne hirurgije kod zdravih ispitanika, sedmog dana dolazi do smanjenja vrednosti indeksa zarastanja, ali bez statistike značajnosti u odnosu na treći dan. Takođe, standardnu tehniku, u grupi DM 2 pacijenata, su pratili slični indeksi zarastanja sedmog i trećeg postoperativnog dana. Poređenjem indeksa zarastanja četrnaestog u odnosu na sedmi i dvadeset prvog dana u odnosu na četrnasti dan, dobijeno je statistički značajno smanjenje indeksa zarastanja među svim ispitivanim grupama i podgrupama (Grafikon 5.4).

Tabela 5.5. Vrednosti indeksa zarastanja nakon komplikovanog vađenja višekorenih zuba u gornjoj vilici, primenom piježohirurgije i standardne hirurgije, kod zdravih i DM 2 pacijenata

Postoperativni dan	Hirurgija	Ispitanici		p
		Zdravi	DM 2	
0	Pijezo	5,63 ± 0,62	6,06 ± 0,68	n.s.
	Standardna	6,31 ± 0,70	6,75 ± 0,86	n.s.
	p	<0,01	<0,05	
3	Pijezo	7,25 ± 0,68	7,38 ± 0,62	n.s.
	Standardna	7,19 ± 0,91	7,13 ± 0,50	n.s.
	p	n.s.	n.s.	
7	Pijezo	6,75 ± 0,58	6,94 ± 0,57	n.s.
	Standardna	6,81 ± 0,40	7,06 ± 0,44	n.s.
	p	n.s.	n.s.	
14	Pijezo	5,88 ± 1,15	6,19 ± 0,91	n.s.
	Standardna	6,19 ± 0,66	6,31 ± 1,01	n.s.
	p	n.s.	n.s.	
21	Pijezo	4,19 ± 0,40	4,56 ± 0,89	n.s.
	Standardna	4,31 ± 0,48	4,12 ± 0,34	n.s.
	p	n.s.	n.s.	

DM 2: dijabetes melitus tip 2; n.s.: nema statističke značajnosti;

Indeks zarastanja: *Mann-Whitney* test



Grafikon 5.4. Promene u indeksu zarastanja ekstrakcionih alveola, posmatranom neposredno nakon hirurške intervencije, kao i na kontrolnim pregledima 3, 7, 14, 21 dana nakon komplikovanih ekstrakcija zuba, primenom pijezohirurgije i standardne hirurgije, kod zdravih i DM 2 pacijenata.

ZDR-S: Zdravi-Standardna hirurgija, ZDR-P: Zdravi-Pijezohirurgija, DM2-S: Dijabetes melitus tip 2-Standardna hirurgija, DM2-P: Dijabetes melitus tip 2-Pijezohirurgija;

Poređenja vrednosti indeksa zarastanja (0. : 3. dan; 3. : 7. dan; 7. : 14. dan; 14. : 21. dan): Friedman test (post hoc Wilcoxon Sign Rank test)

Poređenjem vrednosti rezidualnog volumena postekstrakcione alveole merenih na kontrolnim pregledima, sedmog postoperativnog dana pronađena je značajno manja vrednosti volumena alveole nakon primene standardne hirurgije u odnosu na pijezohirurgiju kod zdravih pacijenata, dok u DM 2 grupi ove razlike nije bilo. Na kontrolnim pregledima trećeg, četrnestog i dvadeset prvog postoperativnog dana vrednosti rezidualnog volumena alveola u zarastanju su bile podjednake između ispitivanih grupa i podgrupa (Tabela 5.6). Najmanje i najpribližnije vrednosti ovog parametra su registrovane dvadeset prvog postoperativnog dana (Tabela 5.6).

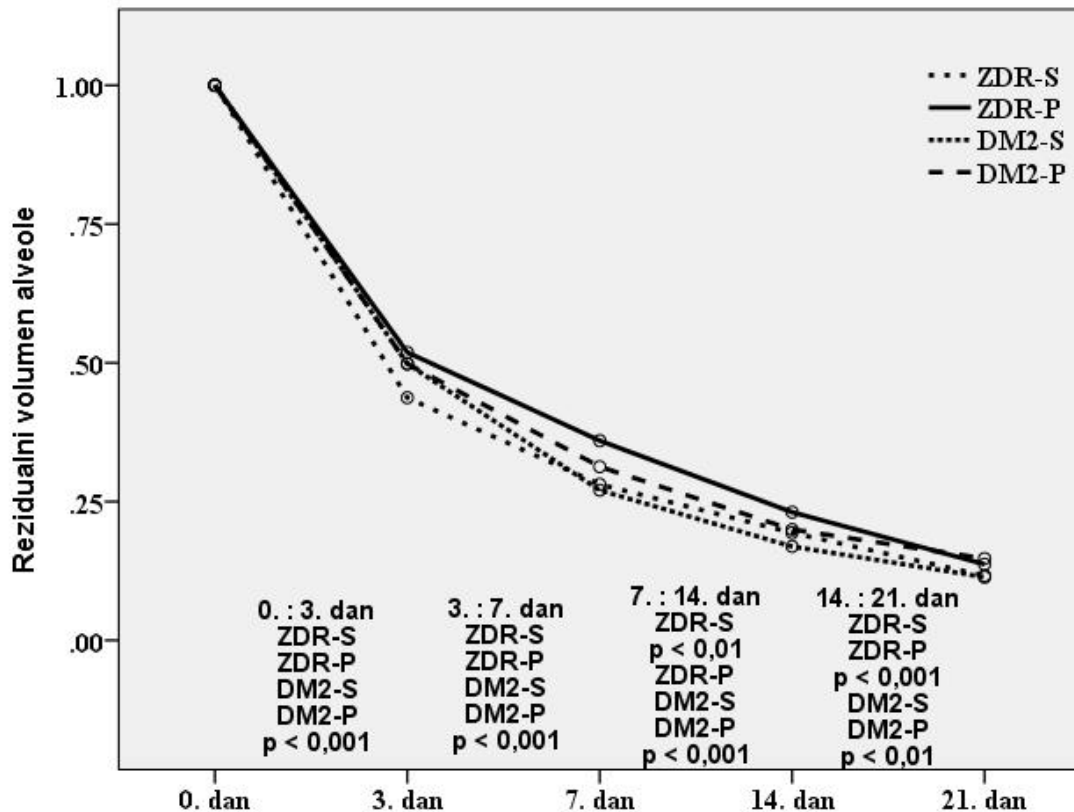
Analizom promena u vrednostima rezidualnog volumena postekstrakcionih alveola, uočeno je da u svim grupama i podgrupama dolazi do statistički značajnog smanjenja rezidualnog volumena na kontrolnim pregledima (Grafikon 5.5). U svim ispitivanim grupama i podgrupama najintenzivnije smanjenje vrednosti volumena je bilo prisutno u prva tri postoperativna dana (Grafikon 5.5). Od trećeg do sedmog postoperativnog dana, ali i u narednim opservacionim vremenskim intervalima, značajno smanjenje rezidualnog volumena alveole je bilo registrovano u svim ispitivanim grupama (Grafikon 5.5).

Tabela 5.6. Vrednosti rezidualnog volumena alveole nakon komplikovanog vađenja višekorenih zuba u gornjoj vilici, primenom piježohirurgije i standardne hirurgije, kod zdravih i DM 2 pacijenata.

Postoperativni dan	Hirurgija	Ispitanici		p
		Zdravi	DM 2	
0	Piježo	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	n.s.
	Standardna	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	n.s.
	p	n.s.	n.s.	
3	Piježo	0,52 ± 0,13	0,50 ± 0,13	n.s.
	Standardna	0,43 ± 0,14	0,50 ± 0,17	n.s.
	p	n.s.	n.s.	
7	Piježo	0,36 ± 0,11	0,31 ± 0,10	n.s.
	Standardna	0,28 ± 0,10	0,27 ± 0,13	n.s.
	p	<0,05	n.s.	
14	Piježo	0,23 ± 0,10	0,20 ± 0,07	n.s.
	Standardna	0,19 ± 0,08	0,17 ± 0,9	n.s.
	p	n.s.	n.s.	
21	Piježo	0,14 ± 0,08	0,15 ± 0,09	n.s.
	Standardna	0,12 ± 0,06	0,12 ± 0,07	n.s.
	p	n.s.	n.s.	

DM 2-dijabetes melitus tip 2; n.s.: nema statističke značajnosti;

Rezidualni volumen alveole: *Mann-Whitney* test



Grafikon 5.5. Promene u rezidualnom volumenu ekstrakcionih alveola posmatranom neposredno nakon hirurške intervencije, kao i na kontrolnim pregledma 3, 7, 14, 21 dana nakon komplikovanih ekstrakcija zuba, primenom piježohirurgije i standardne hirurgije, kod zdravih i DM 2 pacijenata.

ZDR-S: Zdravi-Standardna hirurgija, ZDR-P: Zdravi-Piježohirurgija, DM2-S: Dijabetes melitus tip 2-Standardna hirurgija, DM2-P: Dijabetes melitus tip 2-Piježohirurgija

Poređenja vrednosti rezidualnog volumena postekstrakcione alveole (0. : 3. dan; 3. : 7. dan; 7. : 14. dan; 14. : 21. dan): Friedman test (post hoc Wilcoxon Sign Rank test)

Epitelizacija ekstrakcionih rana

Epitelizacija ekstrakcionih rana procenjivana je komparativnom analizom promera ekstrakcionih alveola (BO, MD, DA) merenih 0, 3, 7, 14 i 21 dana (Tabela 5.7), upoređivanjem promena u promerima BO, MD, DA, kao i poređenjem stope epitelizacije BO, MD i DA promera, koja je predstavljala razliku vrednosti promera (BO, MD, DA) neposredno nakon hirurške intervencije sa promerima alveola merenih na kontrolnim pregledima 3, 7, 14 i 21 dana (Grafikon 5.6, 5.7, 5.8).

Komparativnom analizom promera ekstrakcionih alveola, izraženih u milimetrima, pronađeno je da je BO promer sedmog postoperativnog dana bio statistički značajno manji u grupi zdravih pacijenata nakon primene standardne hirurgije. Takođe, dvadeset prvog dana, uočena je statistički znatno manja dubina ekstrakcione alveole nakon primene standardne hirurgije u odnosu na piježohirurgiju i kod zdravih i kod DM 2 pacijenata (Tabela 5.7). Poređenjem vrednosti promera između ispitivanih grupa i podgrupa nije pronađena statistički značajna razlika na ostalim kontrolnim pregledima (Tabela 5.7).

Buko-oralni promer ekstrakcione alveole značajno je bio redukovano trećeg postoperativnog dana u odnosu na BO promer zabeležen neposredno posle ekstrakcije zuba kod svih ispitivanih pacijenata, bez obzira na prisustvo DM 2 ili primenjenu hiruršku tehniku. Nadalje, analizirajući naredne postoperativne dane, uočeno je statistički značajno smanjenje BO promera alveole sedmog u odnosu na treći postoperativni dan, sa nešto većim stepenom značajnosti kod pacijenata sa DM 2, nego u grupi kada se standardna i piježo tehnika porede kod zdravih pacijenata (Grafikon 5.6 (a)).

Analizom stope epitelizacije između ispitivanih grupa, uočeno je da je u prvih sedam dana bilo prisutno statistički značajno smanjenje BO promera nakon primene standardne tehnike u odnosu na piježohirurgiju kod DM 2 pacijenata (Grafikon 5.6 (b)). Takođe, u ovom vremenskom intervalu u grupi zdravih pacijenata, zabeleženo je intenzivnije smanjenje BO promera nakon primene standardne hirurgije, ali bez statističke značajnosti u odnosu na piježohirurgiju (Grafikon 5.6 (b)).

Komparativna analiza promena vrednosti MD promera ekstrakcione alveole je pokazala statistički značajnu razliku kod svih ispitivanih grupa sa značajnim smanjenjem MD promera između nultog dana (ekstrakcija zuba) i trećeg postoperativnog dana. Ova značajnost je registrovana i poređenjem trećeg postoperativnog dana u odnosu na sedmi postoperativni dan (Grafikon 5.7 (a)).

Analizom stope epitelizacije u vremenskom intervalu od trećeg do sedmog postoperativnog dana zabeleženo je statistički značajno smanjenje MD promera nakon primene standardne hirurgije u odnosu na piježohirurgiju u grupi DM 2 ispitanika (Grafikon 5.7 (b)).

Trend statistički značajnog smanjenja BO i MD je pokazan i u observacionom periodu od sedmog do dvadeset prvog postoperativnog dana (grafikon 5.6 (a), 5.7 (a)). Analiza stope epitelizacije otvora postekstrakcione alveole u ovom vremenskom intervalu bila je znatna, ali ne i statistički značajna posle primene piježohirurgije.

Ovaj parametar je pokazao da primena piježohirurgije dovodi do intenzivnijeg smanjenja MD i BO promera kod zdravih, kao i BO promera kod DM 2 pacijenata, šta nije bio slučaj sa standardnom tehnikom (Grafikon 5.6 (b), 5.7 (b)).

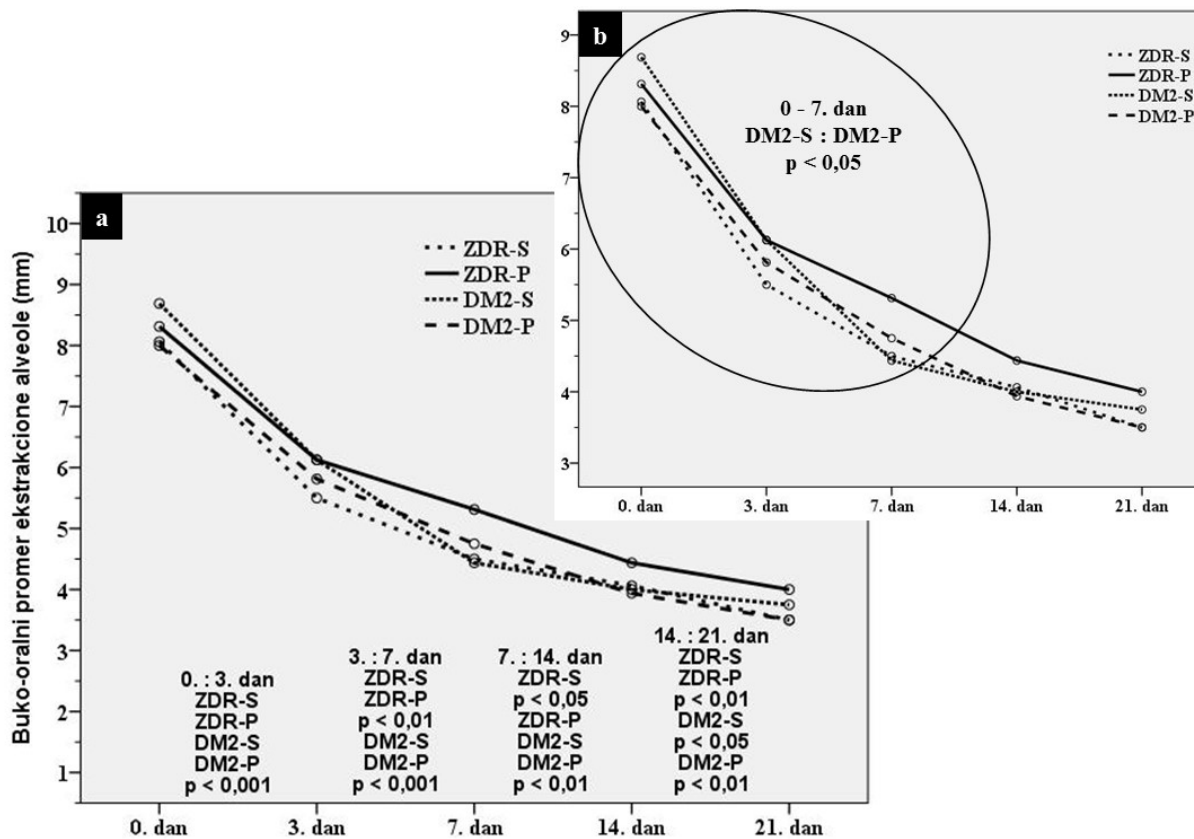
Komparativna analiza promene u vrednostima DA promera postekstrakcione alveole ukazala je na podjednako i značajno smanjenje ovog promera između ispitivanih grupa trećeg u odnosu na nulti, sedmog u odnosu na treći, četrnaestog u odnosu na sedmi, kao i dvadeset prvog u odnosu na četrnasti postoperativni dan (Grafikon 5.8).

Tabela 5.7. Promeri (BO, MD, DA) ekstrakcionih alveola mereni neposredno po hirurškoj intervenciji, kao i na kontrolnim pregledima 3, 7, 14 i 21 dana nakon komplikovanih ekstrakcija višekorenih zuba primenom piježohirurgije i standardne hirurgije u gornjoj vilici, kod zdravih i DM 2 ispitanika.

Dan	Promer alveole (mm)	Ispitanici					
		Zdravi			DM 2		
		Pijezo	Standardna	p	Pijezo	Standardna	p
0	BO	8,31 ± 1,30	8,06 ± 1,84	n.s.	8,00 ± 0,63	8,69 ± 2,02	n.s.
	MD	9,00 ± 1,10	9,13 ± 1,03	n.s.	9,25 ± 1,13	8,88 ± 1,15	n.s.
	DA	7,88 ± 1,41	7,63 ± 1,03	n.s.	7,81 ± 2,20	7,19 ± 1,38	n.s.
3	BO	6,13 ± 1,50	5,50 ± 2,07	n.s.	5,81 ± 1,33	6,13 ± 1,67	n.s.
	MD	7,63 ± 0,81	8,06 ± 1,65	n.s.	7,94 ± 1,73	7,81 ± 1,05	n.s.
	DA	6,56 ± 1,55	5,69 ± 1,58	n.s.	6,44 ± 2,39	5,63 ± 1,75	n.s.
7	BO	5,31 ± 1,62	4,50 ± 2,00	<0,05	4,75 ± 1,13	4,44 ± 1,37	n.s.
	MD	6,94 ± 1,18	7,38 ± 1,71	n.s.	7,38 ± 1,86	6,63 ± 1,09	n.s.
	DA	5,88 ± 1,50	5,19 ± 1,56	n.s.	5,38 ± 2,50	4,94 ± 1,91	n.s.
14	BO	4,44 ± 1,83	4,06 ± 1,84	n.s.	3,94 ± 1,28	4,00 ± 1,46	n.s.
	MD	6,25 ± 1,24	7,06 ± 1,81	n.s.	6,88 ± 1,71	6,25 ± 0,93	n.s.
	DA	5,00 ± 1,51	4,00 ± 1,32	n.s.	4,50 ± 2,13	3,69 ± 1,49	n.s.
21	BO	4,00 ± 2,03	3,50 ± 1,71	n.s.	3,50 ± 1,32	3,75 ± 1,48	n.s.
	MD	5,44 ± 1,37	6,44 ± 1,71	n.s.	6,50 ± 1,46	6,13 ± 0,89	n.s.
	DA	3,75 ± 1,13	2,94 ± 0,10	<0,05	3,56 ± 1,32	2,63 ± 1,20	<0,01

N-broj ispitanika; *DM 2*-dijabetes melitus tip 2; *BO*-buko-oralni promer; *MD*-mezio-distalni promer; *DA*-dubina alveole; *n.s.*: nema statističke značajnosti;

BO, MD, DA promeri postekstrakcionih alveola: *Mann-Whitney test*

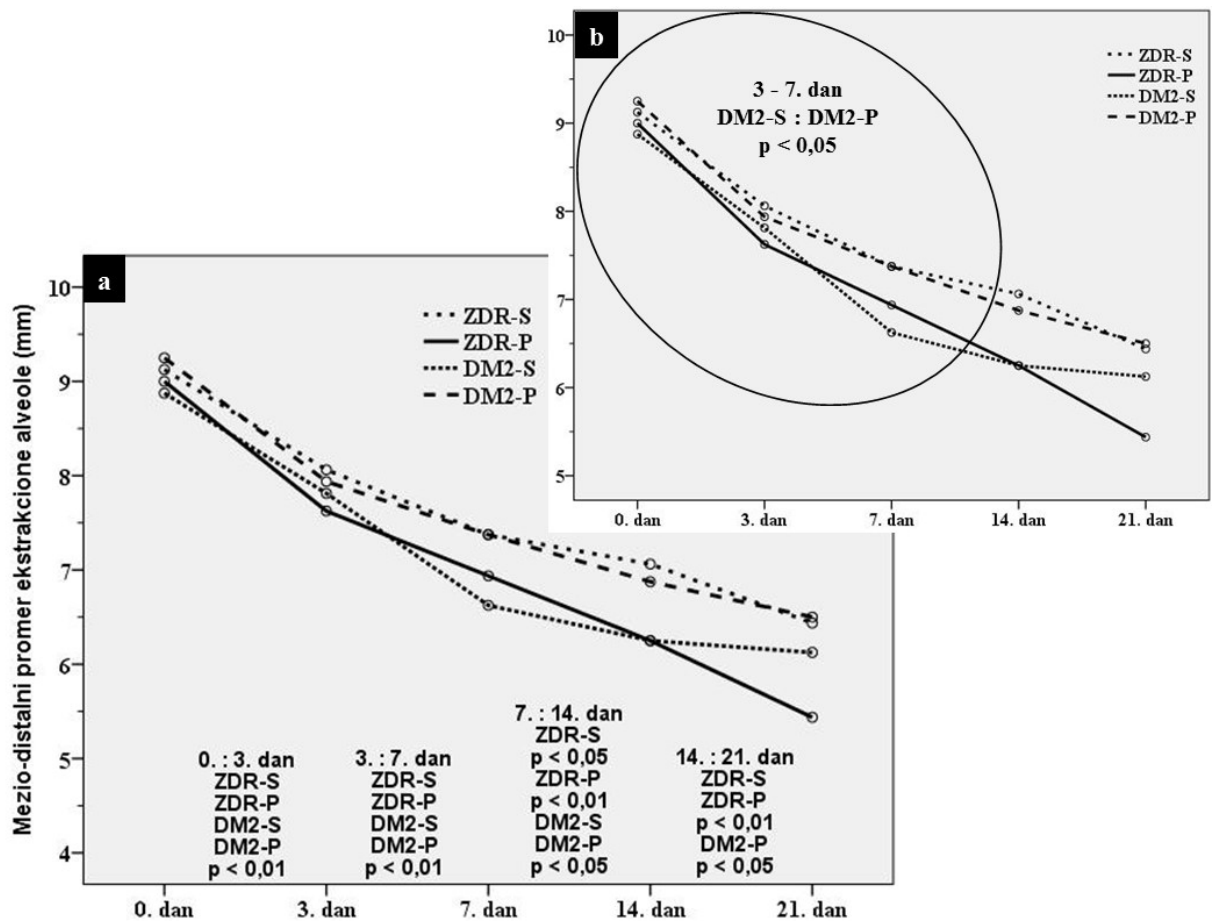


Grafikon 5.6 (a, b). Promene vrednosti BO promera ekstrakcije alveole merenih neposredno po hirurškoj intervenciji, kao i na kontrolnim pregledima 3, 7, 14 i 21 dana nakon komplikovanih ekstrakcija višekorenih zuba, primenom pijezohirurgije i standardne hirurgije u gornjoj vilici, kod zdravih i DM 2 ispitanika

ZDR-S: Zdravi-Standardna hirurgija, ZDR-P: Zdravi-Pijezohirurgija, DM2-S: Dijabetes melitus tip 2-Standardna hirurgija, DM2-P: Dijabetes melitus tip 2-Pijezohirurgija;

a) Poređenja vrednosti BO promera (0. : 3. dan; 3. : 7. dan; 7. : 14. dan; 14. : 21. dan):
Friedman test (post hoc Wilcoxon Sign Rank test)

b) Poređenje stope epitelizacije BO promera (0-7. dan): *Mann-Whitney test*

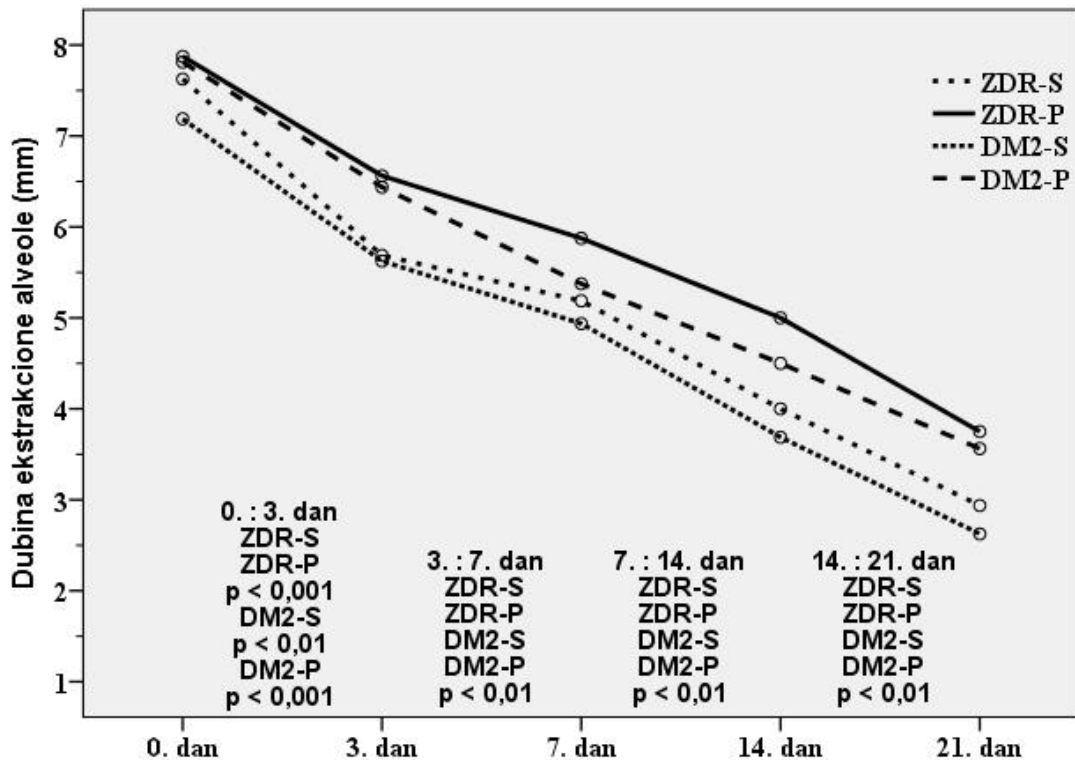


Grafikon 5.7 (a, b). Promene vrednosti MD promera ekstrakcije alveole merenih neposredno po hirurškoj intervenciji, kao i na kontrolnim pregledima 3, 7, 14 i 21 dana nakon komplikovanih ekstrakcija višekorenih zuba, primenom piježohirurgije i standardne hirurgije u gornjoj vilici, kod zdravih i DM 2 ispitanika

ZDR-S: Zdravi-Standardna hirurgija, ZDR-P: Zdravi-Piježohirurgija, DM2-S: Dijabetes melitus tip 2-Standardna hirurgija, DM2-P: Dijabetes melitus tip 2-Piježohirurgija;

a) Poređenja vrednosti MD promera (0. : 3. dan; 3. : 7. dan; 7. : 14. dan; 14. : 21. dan): *Friedman test (post hoc Wilcoxon Sign Rank test)*

b) Poređenje stope epitelizacije MD promera (3-7. dan): *Mann-Whitney test*



Grafikon 5.8. Promene vrednosti DA promera ekstrakcije alveole merenih neposredno po hirurškoj intervenciji, kao i na kontrolnim pregledima 3, 7, 14 i 21 dana nakon komplikovanih ekstrakcija višekorenih zuba, primenom piježohirurgije i standardne hirurgije u gornjoj vilici, kod zdravih i DM 2 ispitanika

Z-Stand: Zdravi-Standardna hirurgija; *Z-Piezo*: Zdravi-Piježohirurgija; *DM-Stand*: Dijabetes melitus tip 2-Standardna hirurgija; *DM-Piezo*: Dijabetes melitus tip 2-Piježohirurgija;

Poređenja vrednosti DA promera (0. : 3. dan; 3. : 7. dan, 7.:14. dan, 14.:21. dan):

Friedman test (post hoc Wilcoxon Sign Rank test)

Svi ispitanici su imali uspešno zarastanje postekstrakcionih rana i nije zabeleženo prisustvo bilo kakvih komplikacija u svim ispitivanim grupama i podgrupama.

VI. Laboratorijski parametri mereni u uzorcima koštanog tkiva uzetim u toku komplikovane ekstrakcije višekorenih zuba u gornjoj vilici primenom pijezohirurgije i standardne hirurgije kod zdravih i DM 2 pacijenata

Ekspresija miR-21 molekula, nivoi VEGF, MMP-9, PTEN proteina i aktivnosti SOD enzima u uzorcima koštanog tkiva

Ekspresija molekula miR-21 je bila statistički značajno veća u uzorcima koštanog tkiva uzetih primenom piježohirurgije u odnosu na standardnu hirurgiju u grupi zdravih ispitanika. Sa druge strane, u grupi DM 2 nije postojala značajna razlika u ekspresiji miR-21 između dve poređene hirurške tehnike. Analizom ekspresije miR-21 u uzorcima kosti zdravih u odnosu na DM 2 pacijente, pronađena je statistički značajno manja ekspresija ovog molekula u koštanom tkivu zdravih pacijenata u odnosu na DM 2 nakon primene obe tehnike (Tabela 6.1).

Koncentracija VEGF proteina je bila značajno veća u koštanim uzorcima nakon primene standardne hirurgije kod zdravih pacijenata, dok kod DM 2 pacijenata nije postojala značajna razlika između dve primenjene tehnike. Takođe, statistički manja koncentracija VEGF proteina je pronađena u koštanim uzorcima DM 2 pacijenata, nakon primene i pijezo i standardne hirurgije, u odnosu na zdrave ispitanike (Tabela 6.1).

Koncentracija MMP-9 proteina je bila znatno veća nakon primene piježohirurgije u odnosu na standardnu hirurgiju u grupi zdravih pacijenata. Takođe, značajno veća koncentracija proteina MMP-9 je bila prisutna u koštanim uzorcima uzetim primenom piježohirurgije kod zdravih u odnosu uzorke uzete ovom tehnikom kod DM 2 pacijenata (Tabela 6.1).

Analizom koncentracije PTEN proteina pronađeno je da su značajno manje koncentracije postojale u uzorcima koštanog tkiva uzetih primenom i piježohirurgije i standardne hirurgije kod zdravih u odnosu na DM 2 pacijente. Unutar grupe zdravih i DM2 pacijenata, nije postojala razlika u koncentraciji PTEN proteina u koštanim uzorcima uzetim ovim ispitivanim tehnikama (Tabela 6.1).

Aktivnost SOD enzima nije bila značajno promenjena između ispitivanih grupa i podgrupa (Tabela 6.1).

Tabela 6.1. Relativna ekspresija miR-21, nivoi VEGF, MMP-9, PTEN proteina i aktivnost SOD enzima u alveolarnoj kosti nakon primene piježohirurgije i standardne hirurgije na modelu komplikovanog vađenja višekorenih zuba u gornjoj vilici, kod zdravih i DM 2 pacijenata

Parametri	Hirurgija	N	Ispitanici		p
			Zdravi	DM 2	
miR-21	Piježo	16	4,33 ± 0,57	5,31 ± 0,63	<0,01
	Standardna	16	3,71 ± 0,42	5,41 ± 0,82	<0,001
	p		<0,05	n.s.	
VEGF	Piježo	16	26,90 ± 5,25	17,88 ± 6,27	<0,05
	Standardna	16	35,93 ± 10,70	19,58 ± 7,52	<0,001
	p		<0,05	n.s.	
MMP-9	Piježo	16	0,41 ± 0,11	0,26 ± 0,06	<0,01
	Standardna	16	0,30 ± 0,11	0,22 ± 0,10	n.s.
	p		<0,05	n.s.	
PTEN	Piježo	16	84,69 ± 44,40	180,0 ± 118,8	<0,05
	Standardna	16	92,50 ± 53,36	218,1 ± 106,5	<0,001
	p		n.s.	n.s.	
SOD	Piježo	16	58,20 ± 12,15	67,27 ± 15,18	n.s.
	Standardna	16	57,60 ± 8,59	62,26 ± 10,41	n.s.
	p		n.s.	n.s.	

N: broj ispitanika; DM 2: dijabetes melitus tip 2; miR-21: mikroRNK-21; VEGF: faktor rasta vaskularnog endotela; MMP-9: matriksna metaloproteinaza-9; PTEN: fosfataza i tenzin homolog; SOD: superoksid-dizmutaza; n.s.: nema statističke značajnosti; miR-21, VEGF, SOD: *t*-test; MMP9, PTEN: *Mann-Whitney* test

DISKUSIJA

Zahvaljujući minimalno invazivnom pristupu, pored brojnih indikacija, pijezohirurgija se danas široko primenjuje i za hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka (Al-Moraissi EA i sar., 2016), kao i u minimalno invazivnim ekstrakcijama zuba (Blus C, Szmukler-Moncler S, 2010), sa ciljem smanjenja hirurške traume i kvalitetnijeg postoperativnog oporavka.

Rezultati ove kontrolisane kliničke studije ukrštenog dizajna odnose se na ispitivanje i upoređivanje uticaja pijezohirurgije i standardne hirurgije na parametre postoperativnog oporavka, kao i na parametre rane inflamatorne faze koštanog zarastanja, pri hirurškoj ekstrakciji donjih impaktiranih umnjaka kod zdravih pacijenata, čije koncentracije u koštanom tkivu zavise od stepena hirurške traume (Miron RJ i sar., 2013). Za procenu postoperativnog oporavka pacijenata, nakon hirurške ekstrakcije impaktiranih umnjaka u donjoj vilici, registrovani su i upoređivani parametri evaluacije postoperativnog bola, trizmusa i otoka, dok su uticaji primenjenih hirurških tehnika na mehanizme ćelijskog i molekularnog nivoa koštanog zarastanja ispitivani poređenjem nivoa VEGF i IL-1 β proteina, aktivnosti SOD enzima, kao i ekspresije miR-21 molekula u alveolarnom koštanom tkivu.

Efekat pijezohirurgije u odnosu na standardni pristup hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka je do sada ispitivan u brojnim istaživanjima poređenjem trajanja hirurških intervencija, parametara bola, otoka i trizmusa (Al-Moraisi EA i sar., 2016). Međutim, dublje razumevanje ćelijskih i molekularnih mehanizama humanog koštanog i mekotkivnog zarastanja, nakon primene pijezohirurgije u odnosu na standardnu hirurgiju donjih trećih molara (Badenoch-Jones EK i sar., 2016), bi moglo dati odgovor na pitanje: da li pijezohirurgijom uzrokovana smanjena inflamatorna reakcija predstavlja mogući razlog za povoljniji postoperativni oporavak pacijenata, uprkos prolongiranom trajanju hirurške intervencije (Goyal M et al., 2012)? Sa druge strane, smanjenje inflamatorne reakcije moglo bi da uspori proces zarastanja hirurške rane, uzimajući u obzir da je upravo faza inflamacije od značaja u procesima fiziološkog zarastanja (Thomas MV, Puleo DA, 2011). Sa tim u vezi, činjenica da do sada nema podataka u literaturi o uticaju pijezohirurgije na ćelijske i molekularne mehanizme koštanog zarastanja na modelu hirurške ekstrakcije donjih trećih molara, rezultatima ove studije daje poseban značaj.

Dobijeni rezultati su ukazali na znatno povoljniji postoperativni oporavak pacijenata nakon primene pijezohirurgije u odnosu na standardnu hirurgiju. Tačnije, veći intenzitet bola prvog dana, kao i izraženiji trizmus trećeg dana bili su prisutni

nakon standardne hirurške ekstrakcije. Na molekularnom nivou, piježohirurgija je bila praćena sa povećanom ekspresijom inflamatorno-modulatorne miR-21 i smanjenim nivoom VEGF-a u alveolarnoj kosti. Takođe, rezultati korelacijskih testova su ukazali na značajnu povezanost samo molekula miR-21 u koštanom tkivu sa vremenom javljanja bola nakon hirurške intervencije.

Dobijeni rezultati bi mogli da se obrazlože činjenicom da hirurška ekstrakcija donjih impaktiranih umnjaka, kao često korišten model za ispitivanje kliničkih parametara postoperativnog oporavka i inflamatorne reakcije (Akbulut N i sar., 2014), predstavlja fizičku povredu mekog i koštanog tkiva, koja dovodi do oslobađanja inflamatornih medijatora i kasnije se odražava na težinu postoperativnog bola, otoka i trizmusa (Schultze-Mosgau S i sar., 1995; Cotran RS, Kumar V, Collins T, 1999). Poznato je, isto tako, da je postoperativni oporavak pacijenata nakon hirurške ekstrakcije donjih trećih molara uslovljen brojnim faktorima, kao što su anatomske karakteristike vilica i zuba, zdravstveni status pacijenta, ali i vrstom i dužinom trajanja hirurške intervencije. Sa tim u vezi, dublje impakcije zuba, koje zahtevaju uklanjanje veće kolićine koštanog tkiva i odizanje šireg mukoperiostalnog reznja, praćene su većim rizikom za nastanak postoperativnog bola i trizmusa, za razliku od mekotkivnih impakcija ili delimićnih koštanih impakcijama, kod kojih je samo rizik za pojavu trizmusa smanjen (Baqain ZH i sar., 2008; Ravikumar KK i sar., 2018). Shodno tome, u ovoj studiji vršeno je ispitivanje nivoa inflamatornih regulatora u koštanom tkivu, uzetom iz neposredne blizine hirurške regije, kako bi se utvrdila mogućnost postojanja korelacije između ćelijskih i molekularnih mehanizama rane inflamatorne faze koštanog zarastanja sa stepenom postoperativnog morbiditeta kod pacijenata nakon hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka.

Uprkos činjenici da duže trajanje hirurških ekstrakcija donjih impaktiranih umnjaka, kao i njihova veća hirurška težina, doprinose javljanju znaćajno jaćeg postoperativnog bola kod pacijenata (Lago-Mendez L i sar., 2007), rezultati ove studije su ukazali na znaćajno manji intenzitet bola, meren VAS skalom, prvog postoperativnog dana nakon primene piježohirurgije, dok je intenzitet bola trećeg dana bio manji, ali bez statistićeke znaćajnosti u odnosu na standardnu hiruršku ekstrakciju. Takođe, statistićeki znaćajno duže trajanje hirurških intervencija, kao i trajanje osteotomija je bilo registrovano nakon primene piježohirurgije u poređenju sa standardnim pristupom i kod zdravih i kod DM 1 pacijenata. Ovakav nalaz znaćajno manjeg intenziteta bola i dućeg trajanja intervencije nakon primene piježohirurgije je

u saglasnosti sa rezultatima studija Goyal i sar., i Mantovani i sar., dok su Barone i sar., pronašli manji intenzitet bola nakon primene piježohirurgije u odnosu na standardni pristup, ali bez statističke značajnosti (Goyal M i sar., 2012; Mantovani E i sar., 2014; Barone A i sar., 2010). Nasuprot tome, istraživanja Sivollele i sar., su ukazala na podjednake intenzitete bola između piježohirurgije i standardne hirurgije, dok su Rullo i sar. pronašli da su kompleksne hirurške ekstrakcije donjih imaktiranih umnjaka praćene značajno manjim bolom i kraćim intervencijama nakon primene standardnog pristupa u poređenju sa piježohirurgijom (Sivollela S i sar., 2011; Rullo R i sar., 2013). Imajući u vidu činjenicu da evaluacija postoperativnog bola treba da bude vršena u prvih sedamdeset dva sata nakon hirurške intervencije (Lago-Mendez L i sar., 2007; Garcia Garcia A i sar., 1997; Oikarinen K, 1991), opravdano je smatrati da nepostojanje razlike u intenzitetu bola između piježohirurgije i standardne hirurgije u studiji Sivollele i sar. može biti rezultat neadekvatnog odabira vremenskih okvira evaluacije intenziteta bola. Zapravo u istraživanju Sivollele i sar., merenje intenziteta bola je vršeno sedmog i tridesetog dana nakon hirurške intervencije. Takođe, nalaz značajno manjeg intenziteta bola nakon standardnog pristupa u studiji Baronea i sar., može biti prihvatljiv, imajući u vidu da su ispitanici ove studije nakon hirurške ekstrakcije primenom upravo standardne tehnike koristili značajno veći broj analgetika u prvih sedam postoperativnih dana, te je i razumljivo da je manji intenzitet bola bio rezultat njegove bolje analgetičke kontrole.

Osećaj bola nakon hirurških ekstrakcija je subjektivni osećaj, uslovljen individualnim pragom bola, koji može biti determinisan različitim faktorima uključujući anksioznost, godine i pol pacijenata, kao i težinu hirurške ekstrakcije (Berge TI, Boe OE, 1991; Pollmann L, 1983; Capuzzi P i sar., 1994). Sa tim u vezi, kako bi pojačali evaluaciju postoperativnog bola kod pacijentata, korištene su dodatne variable, kao što su vremena koja proteknu do javljanja prvog postoperativnog bola i uzimanja provog analgetika na danu hirurške intervencije (Brajkovic D i sar., 2014). Štaviše, pronađeno je da su oba vremenska parametra bila značajno produžena u piježohirurškoj grupi u odnosu na standardnu grupu, šta bi moglo ukazati na manji stepen uzrokovane traume tkiva piježohirurgijom i sledstvenu manju inflamaciju, usled znatno odloženog javljanja bola i potrebe za uzimanjem analgetika. Ovakav nalaz bi mogao ići u prilog činjenici da je piježohirurško sećenje koštanog tkiva znatno manje traumatično (Vercelloti T i sar., 2005) i da uzrokuje smanjeno oslobađanje inflamatornih medijatora u koštanom i mekom tkivu (Preti G i sar.,

2007). Štaviše, studija Martini i sar., ukazala je na brži oporavak C reaktivnog proteina, kao markera sistemske inflamacije, ali samo nakon primene pijezohirurgije u kranio-facijalnoj hirurgiji (Martini M i sar., 2017), dok su Zizzari i sar. ukazali da primena pijezohirurgije može dovesti do smanjenja inflamatorne reakcije u koštanom tkivu nakon ugradnje implantata i na taj način uzrokuje intenzivnije početne faze koštanog zarastanja oko tela implantata (Zizzari VL i sar., 2015). Ovakvi nalazi najverovatnije su rezultat kliničkih prednosti pijezohirurškog rada u odnosu na konvencionalne sisteme kao šta su: selektivnost i preciznost sečenja, bez oštećenja okolnih mekih tkiva (Robiony M i sar., 2004), bolja kontrola nad instrumentom u procesu sečenja (Garg AK i sar., 2007; Schaller BJ i sar., 2005), bolja vidljivost hirurške regije i hlađenje pijezohirurškog nastavka usled fenomena kavitacije (Leclercq P i sar., 2008).

Klinički rezultati ove studije su pokazali da je trizmus trećeg postoperativnog dana bio značajnije izražen sa strane gde je vršena standardna hirurška ekstrakcija, kao i da je bilo prisutno značajno povećanje u intenzitetu trizmusa trećeg u odnosu na prvi postoperativni dan, takođe samo nakon primene standardne tehnike. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatima prethodnih kliničkih studija (Barone A i sar., 2010; Sortino F i sar., 2008) i može se objasniti znatno manje traumatičnom manipulacijom mukoperiostalnog režnja u toku pijezohirurškog odizanja, imajući u vidu da je pojava trizmusa u pozitivnoj korelaciji sa traumom i manipulacijom mekih tkiva mukoperiostalnog režnja. Sa tim u vezi, dokumentovano je klinički (Goyal M i sar., 2012), kao i eksperimentalno, gde je upotreba pijezohirurških instrumenata u toku subperiostalne preparacije bila udružena sa očuvanom periostalom mikrocirkulacijom (Stoetzer M i sar., 2014). Štaviše, poznato je da je glavna prednost pijezohirurškog pristupa, pored njegovog selektivnog i kontrolisanog sečenja, prevencija oštećenja mekotkivnih struktura. Ovaj tip oštećenja je češće moguć tokom konvencionalnog odizanja mukoperiostalnog flapa u smislu cepanja periosta i mišićnih vlakana, šta se može smatrati osnovom znatno izarženijeg trizmusa u našoj studiji nakon primene standardne tehnike. Slični klinički efekti hirurškog vađenja umnjaka uočeni su i sa pojavom postoperativnog otoka, koji po poravilu prati ovakav tip oralno-hirurških intervencija u prvih nekoliko postoperativnih dana.

U literaturi je poznato da je inflamatorna reakcija tkiva neophodna u zarastanju koštanog tkiva, ali samo u uslovima dobro regulisane inflamacije, koja ostvaruje pozitivan uticaj sredine u predelu hirurške rane (Thomas MV, Puleo DA, 2011). Sa

druge strane, preterana inflamatorna reakcija, nastala usled poremećaja ravnoteže u oslobađanju inflamatornih i anti-inflamatornih mediatora, može dovesti do otežanog koštanog zarastanja praćenog pojavom komplikacija (Mountziaris PM, Mikos AG, 2008). Značajno je istaći da je studija Blaskovica i sar., primenom skenirajuće elektronske mikroskopije, ukazala na različiti izgled koštanih defekata neposredno nakon primene standardnih osteotomskih sistema u odnosu na pijezohirurgiju (Blaskovic M i sar., 2016). Naime, pijezohirurškim pristupom inicirana je intenzivnija početna faza koštanog zarastanja na površinama formiranih koštanih defekata. Takođe, za razliku od grupe gde su korištena rotirajuća svrdla za osteotomije, u pijezo grupi nije bilo ostataka debrisa i koštanih fragmenata na osteotomskim površinama, koje bi mogle biti uzrok usporenog zarastanja (Gabrić Pandurić D i sar., 2012). Debris hirurških rana zahteva aktivaciju makrofagnog sistema, kao i jaču indukciju inflamatorne faze, šta ide u prilog ne samo pojačanoj, nego i produženoj inflamatornoj fazi zarastanja operativne regije. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je nivo VEGF proteina, mediatora osetljivog na traumu koštanog tkiva, bio značajno veći u koštanim uzorcima uzetih standardnim pristupom u odnosu na pijezohirurgiju, ukazujući da se nivo oslobođenog VEGF-a može odraziti na stepen hirurške traume. Sa tim u vezi, Nakai i sar. su pokazali da se nivo VEGF-a, oslobođen od strane osteoblasta, povećava kao odgovor na mehanički stres (Hu K, Olsen BR, 2016). Imajući u vidu da osteotomija indukuje povećanu ekspresiju različitih proinflamatornih citokina: IL-1, IL-6, IL-8 i TNF- α , koji sledstveno mogu stimulisati ekspresiju VEGF proteina (Maloney JP, Gao L, 2015), kao i značajnu ulogu VEGF-a u inflamatornim mehanizmima nakon hirurške traume u koštanom tkivu (Marsland AL i sar., 2017), rezultati ove studije mogu ići u prilog izraženijem ranom inflamatornom odgovoru organizma nakon primene standardne tehnike. Sa druge strane, VEGF indukuje transkripciju različitih pro-inflamatornih gena i tako ima ulogu pro-inflamatornog citokina, jer uzrokuje povećanu propustljivost endotelnih ćelija i reguliše migraciju monocita (Reinders ME i sar., 2003; Hao Q i sar., 2009). Polazeći od pretpostavke da je VEGF marker inflamacije i prateći njegovu moguću povezanost sa kliničkim parametrima u ovoj studiji, rezultati analize nisu pokazali korelaciju VEGF-a sa bilo kojim postoperativnim kliničkim parametrom.

Inflamatorni citokini koji dovode do štetnog inflamatornog efekata u ćelijama i tkivima su uglavnom članovi IL-1 familije, a to su interleukin 1 alfa (IL-1 α) i IL-1 β (Rock KL i sar., 2010). Iako oba člana (α i β) ispoljavaju svoje dejstvo vezivanjem za

IL-1 receptore, njihovo oslobađanje može biti regulisano različitim stimulusima (England H i sar., 2014). U ovoj studiji, nivo ekspresije IL-1 β proteina u uzorcima alveolarne kosti nije bio različit između piježohirurških i standardnih osteotomija. Pretpostavka da povoljni uslovi na ćelijskom nivou u piježo grupi mogu biti otkidač znatno većeg oslobađanja IL-1 β u odnosu na IL-1 α , a manje oslobađanje IL-1 β u standardnoj grupi, može biti obrazložena različitim izgledom piježohirurških osteotomskih površina koštanih defekata (Blaskovic M i sar., 2016), kao i činjenicom da okolnosti na ćelijskom nivou i mehanizmi ćelijske smrti uslovljavaju različito oslobađanje IL-1 formi (England H i sar., 2014). Takođe, nepostojanje razlike u nivou ekspresije IL-1 β proteina u koštanom tkivu između ispitivanih hirurških tehnika može biti posledica nemogućnosti za uzimanjem većeg broja uzoraka koštanog i mekog tkiva operativne regije u različitim vremenskim okvirima nakon intervencije sa ciljem dublje analize rane inflamatorne faze. Ova nemogućnost predstavlja i ograničenje u studiji, za potpunije razumevanje povezanosti signalnih puteva osteotomije i inflamatornog odgovora organizma.

Rezultati sadašnje studije su pokazali da je ekspresija molekula miR-21 bila značajno manja u koštanim uzorcima uzetih standardnim pristupom u odnosu na piježohiruršku tehniku. Štaviše, kako je viši nivo ekspresije miR-21 u piježohirurškoj grupi bio konzistentan među muškarcima i ženama, kao i među različitim starostnim dobima, dobijeni rezultati ukazuju da je ekspresija molekula miR-21 u koštanom tkivu direktno uslovljena različitom vrstom i stepenom stresa usled traume tkiva prouzrokovane hirurškom tehnikom. Sa tim u vezi, pokazano je da miR-21, učestvujući u neposrednom odgovoru organizma na stress (Zhang T i sar., 2019; Permenter MG i sar., 2019; Tahamtan A i sar., 2018; Li P i sar., 2019) uključen u poremećajima ćelijske funkcije uzrokovane mehaničkom silom u *in vitro* uslovima (Ma X i sar., 2011). Preciznije, Wei i sar. su pokazali da spoljašnja mehanička sila različito utiče na miR-21 u osteoblastično diferentovanim stem ćelijama periodontalnog ligamenta (Wei F i sar., 2015) i na taj način, nivo ekspresije miR-21 može biti uslovljen i vrstom primenjene hirurške tehnike. Međutim, smanjena ekspresija miR-21 neposredno nakon osteotomske traume je verovatno rezultat pojačane inflamatorne reakcije prouzrokovane standardnom tehnikom. Zapravo, tokom hirurške procedure, mehanički stres inicira inflamatornu reakciju, koju najvećim delom regulišu makrofagi (Miron RJ i sar., 2013). Takođe, miR 21, kao najviše zastupljena miR u makrofazima, igra ključnu ulogu u smirivanju inflamatorne

reakcije (Canfran-Duque A i sar., 2017; Das A i sar., 2014) uzrokovanu hirurškom povredom. Poznato je da miR-21 ispoljava anti-inflamatorna svojstva supresijom NF- κ B signalnog puta (Ma X i sar., 2011). Sa tim u vezi, imajući u vidu inflamacijom regulisanu aktivnost miR-21, povećana ekspresija miR-21 u koštanom tkivu nakon primene piježohirurgije, može ukazati na njen doprinos u sledstvenom manjem inflamatornom odgovoru tkiva na uzrokovanu traumu. Sa ciljem da istražimo takvu pretpostavku, ispitali smo povezanost ekspresije miR-21 u koštanom tkivu sa parametrima postoperativnog bola i trizmusa i pronašli značajnu pozitivnu korelaciju ekspresije ovog molekula sa vremenom javljanja prvog postoperativnog bola nakon primene i standardne i piježohirurgije. Štaviše, registrovali smo značajnu povezanost između nivoa ekspresije molekula miR-21 i trizmusa trećeg dana, kao i intenziteta bola prvog dana, ali samo u grupi gde je korištena standardna osteotomska tehnika i gde je bio prisutan statistički značajno izraženiji bol i trizmus. Dakle, na osnovu dobijenih rezultata bi se moglo zaključiti da miR-21 može učestvovati u regulaciji inflamacije nakon hirurških ekstrakcija zuba i na taj način predstavljati hirurški marker početka sledstvenih postoperativnih tegoba kod pacijenata.

Poznato je da su hemotaksa i migracija leukocita u inflamirani predeo rane praćeni angiogenezom i tako angiogeneza i inflamacija predstavljaju međusobno zavisne i kordinirane procese u toku zarastanja rana (Mor F i sar., 2004; Sivak JM i sar., 2011). Značajno je reći da je ekspresija miR-21 usko vezana sa nivoom VEGF proteina u procesu angiogeneze. Preciznije, u endotelnim ćelijama umbilikalnih vena na humanom modelu, preterana ekspresija miR-21 potpomaže VEGF-om vođenu angiogenezu, dok inhibicija miR-21 uzrokuje poremećaj u angiogenezi (Jiang FS i sar., 2015). Takođe, eksperimenti koji su koristili humane transformisane bronhijale epitelne ćelije su pokazali da miR-21 iz egzozoma dovodi do povećanja nivoa VEGF-a, preko aktivacije specifičnog signalnog molekula – prenosnika signala i aktivatora transkripcije 3 (*eng. signal transducer and activator of transcription 3-STAT3*), vodeći ka povećanoj angiogenezi, dok neutralisanje STAT3 dovodi do smanjene ekspresije miR-21 i inhibirane angiogeneze (Liu Y i sar., 2016).

Ovakvi podaci međusobne regulacije miR-21 i VEGF-a mogu predstavljati objašnjenje da smanjena ekspresija molekula miR-21 može biti kompenzovana sa povećanjem nivoa VEGF u koštanim uzorcima nakon primene standardne tehnike.

Različite hirurške tehnike su udružene sa značajnim povećanjem nivoa oskidativnog stresa i sledstvenim oslobađanjem markera inflamacije (Abid MR i sar.,

2004). Takođe, nagomilavanje slobodnih kiseoničnih radikala (ROS) je odgovorno za znatnu inflamatornu reakciju udruženu sa ćelijskim oštećenjem, kao posledicu hirurške traume (Reside J i sar., 2015). Sa tim u vezi, u sprovedenoj studiji je ispitivana aktivnost SOD enzima, najzastupljenijeg antioksidansa u prvoj liniji odbrane organizma od slobodnih radikala. Rezultati su pokazali da nema promene u aktivnosti SOD enzima između ispitivanih grupa, šta može biti rezultat njegove različite regulacije od strane miR-21 i VEGF-a. Zapravo, pokazano je da VEGF indukuje oslobađanje enzima SOD, kako u uslovima induktionog, tako i bazalnog nivoa ROS (Zhang X i sar., 2012), dok, sa druge strane, miR-21 učestvuje u regulaciji nivoa ROS, kao rezultat supresije gena za sintezu enzima iz SOD familije u bronhialnim epitelnim ćelijama na humanom modelu (Stoica SC i sar., 2019). Štaviše, Gulnahr i sar. su pokazali da ekspresija toplotnog šok proteina 70 (*eng. Heat Shock Protein 70-HSP70*), kao mogućeg biomarkera neposrednog postoperativnog stresa, je bila dva puta veća u standardnoj grupi u odnosu na pijezo grupu i tako ukazali da pijezo hirurgija, uzrokujući manji stres, doprinosi ćelijskoj obnovi nakon hirurške procedure (Gulnahr Y i sar., 2013).

Kako je DM 1 metaboličko oboljenje, koje se za razliku od DM 2 češće javlja u mlađoj populaciji, kliničko ispitivanje pacijenata obolelih od DM 1, u ovoj doktorskoj disertaciji, je bilo vezano za hirurško vađenje impaktiranih umnjaka, kao hirurškoj indikaciji učestaloj u mlađoj populaciji pacijenata. Klinički rezultati praćenja parametara postoperativnog toka, imajući u vidu veličinu uzorka od samo pet pacijenta, nisu ukazali na postojanje značajnosti u intenzitetu bola, trizmusa i otoka između pijezo i standardnog pristupa ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka kod DM 1 pacijenata.

S obzirom na manju učestalost DM 1 pacijenata sa potrebom za obostranim hirurškim vađenjem donjih simetrično impaktiranih umnjaka, kao i specifične kriterijume za uključivanje pacijenata u studiju, jedan od nedostataka ove doktorske disertacije je bila nemogućnost prikupljanja dovoljne težine uzorka koštanog tkiva za ćelijska i molekularna laboratorijska ispitivanja signalnih molekula. Pored toga, količina koštanog tkiva je bila definisana zapreminom i lokalizacijom u kojoj se očekuju promene nivoa i aktivnosti signalnih molekula, shodno do sada objavljenoj literaturi. Svaka relevantna analiza na ovom nivou zahtevala je značajno povećanje veličine i snage uzorka.

Ako se u obzir uzme činjenica da je postoperativni oporavak kod pacijenata nakon hirurške ekstrakcije impaktiranih umnjaka u donjoj vilici primenom piježohirurgije uspešan, kako sa aspekta smanjenja postoperativnog morbiditeta, tako i udruženog efekta proinflamatornih mehanizama, za očekivati je da u uslovima redukovanog kliničkog odgovora u procesu zarastanja hirurških rana, kao što su uslovi koje prouzrokuju DM 2, pomenute prednosti ove nove hirurške terapije budu značajne u odnosu na dosadašnji standardan pristup. Model praćenja zarastanja hirurških rana u DM 2 primenjen je prilikom komplikovanih vađenja višekorenih zuba, imajući u vidu vremenski interval pojave DM 2 kod srednjeg i starijeg uzrasta, u odnosu na hirurško vađenje umnjaka, koje je, po pravilu, prisutno kod mlađih pacijenata. S tim u vezi, u ovoj doktorskoj disertaciji praćen je biološki odgovor zarastanja hirurške rane (tkivni nivo), kao i promene na nivou transdukcionih signalnih mehanizama (ćelijski i molekularni nivo), prilikom hirurške traume na koštanom i mekom tkivu u toku komplikovanog vađenja višekorenih zuba piježohirurškim i standardnim pristupom, kod zdravih i DM 2 pacijenata. Imajući u vidu činjenicu da do sada nema podataka u literaturi o primeni i efektima piježohirurgije kod pacijenata rizika, kao što su pacijenti oboleli od DM 2, rezultati ove doktorske disertacije daju značajan uvid u terapijske postupke i kvalitet zarastanja intraoralnih rana.

Uzimajući u obzir ispitivani hirurški model, dobijeni rezultati na tkivnom nivou su pokazali da su komplikovane ekstrakcije nakon primene piježohirurgije kod pacijenata sa DM 2 praćene značajno manjim intenzitetom bola i njegovim kasnijim javljanjem, zatim značajno boljim kliničkim izgledom gingive ekstrakcione alveole na danu hirurške intervencije i sedmog postoperativnog dana, kao i intenzivnijim oporavkom izgleda gingive sedmog u odnosu na treći postoperativni dan. Takođe, analiza parametara zarastanja ekstrakcione alveole je ukazala da je indeks zarastanja na danu intervencije bio značajno manjih vrednosti nakon primene piježohirurgije kod DM 2 pacijenata, šta ide u prilog intenzivnijem zarastanju, a praćen je značajnim smanjenjem u vrednostima indeksa sedmog u odnosu na treći postoperativni dan i to samo nakon primene piježohirurgije. Konačno, analize stope epitelizacije promera ekstrakcionih alveola su pokazale da je smanjenje BO promera u prvih sedam dana, kao i MD promera od trećeg do sedmog dana, bilo značajnije nakon primene standardne hirurgije u grupi DM 2 ispitanika. Na molekularnom nivou registrovana je značajna razlika u ekspresiji miR-21 molekula, kao i nivoima VEGF-a i MMP-9

proteina u koštanom tkivu uzetom pijezohirurgijom u odnosu na standardnu hirurgiju, ali samo kod zdravih pacijenata, dok ove razlike između ispitivanih hirurških tehnika nije bilo kod DM 2 pacijenata. Štaviše, značajna razlika između zdravih i DM 2 pacijenata je registrovana u nivoima VEGF i PTEN proteina, nezavisno od primenjenih hirurških tehnika, kao i u koncentraciji MMP-9 proteina, ali samo nakon pijezohirurgije. Konačno, u uzorcima alveolarnog koštanog tkiva DM 2 pacijenata je registrovan značajno veći nivo ekspresije molekula miR-21 u odnosu na zdrave pacijente nakon primene i pijezo i standardne hirurške tehnike.

U stručnoj literaturi, postoje naučni podaci o uticaju efekta pijezohirurškog pristupa u kvalitetu postoperativnog zarastanja rane zdravih pacijenata, ali samo nakon jednostavnih ekstrakcija zuba, kao i procedura alveoplastike, primenom ukrštenog dizajna istraživanja (Mozzati M i sar., 2014; Gangwani KD i sar., 2018). Studija Mozzati i sar., je na modelu jednostavnih ekstrakcija zuba ukazala da nije bilo razlike u zarastanju rana između pijezohirurškog i standardnog pristupa, dok su autor Gangwani i sar., upoređujući pijezohirurgiju sa standardnom metodom alveoplastike registrovali značajno bolje i intenzivnije zarastanje nakon primene pijezohirurgije. Ovaj efekat autori Mozzati i sar., su obrazložili manjom hirurškom traumom tkiva koju prouzrokuje pijezoelektrični efekat u procedurama ekstrakcija zuba, dok su Gangwani i sar., značajno intenzivnije zarastanje objasnili prednostima pijezohirurgije, kao što je prezervirajući efekat pijezoelektričnog pristupa ka mekim tkivima i sledstvenom potrebom za minimalno invazivnim subperiostalnim tunel pristupom, kako bi se ostvario pristup za uklanjanje koštanih neravnina. Naime, autori su Mozzati i sar., su pokazali da je dužina trajanja intervencija primenom pijezohirurgije bila veća u odnosu na standardnu ekstrakciju, ali bez statistički značajne razlike. Slično nalazu studije Mozzati i sar., rezultati ove studije su pokazali da je ukupna dužina trajanja komplikovanih ekstrakcija višekorenih zuba u gornjoj vilici bila podjednaka nakon primene pijezohirurgije u odnosu na standardni pristup u grupi zdravih pacijenata. Štaviše, rezultati ove doktorske disertacije su ukazali na dodatno objašnjenje trajanja pijezohirurške osteotomije i odontotomije u toku komplikovanih ekstrakcija zuba i pronađeno je njihovo značajno duže trajanje, u odnosu na rotirajuća svrdla i u grupi zdravih i DM 2 ispitanika.

Sa druge strane, studija Gangwani i sar., je ukazala na značajno kraće trajanje intervencije alveoplastike u pijezohirurškoj grupi. Ovakav rezultat autori Gangwani i sar., su obrazložili činjenicom da zahvaljujući preventivnom efektu ka mekim

tkivima, piježohirurške alveoplastike su bile vršene pristupom kroz subperiostalne tunele, koji kasnije nisu zahtevali ušivanje, za razliku od alveoplastike primenom standardnog pristupa, gde je bilo potrebno široko odizanje reznja, kako bi se pristupilo koštanim površinama, bez traume okolnih mekotkivnih struktura, a potom i dodatno ušivanje mukoperiostalnog reznja. Nadalje, Martini i sar., na nešto drugačijem hirurškom modelu, odnosno upoređujući efekte piježohirurgije i standardne hirurgije u kranioplastikama kod dece sa kraniostenozom, pronašli da je trajanje piježohirurških osteotomija bilo dva puta duže u odnosu na osteotomije formirane svrdlima i oscilirajućim testerama. Štaviše, slično rezultatima naše studje, ukupno trajanje hirurških intervencija u studiji Martini i sar. je bilo podjednako nakon primene ispitivanih hirurških tehnika, uprkos značajno produženom trajanju piježohirurške osteotomije (Martini M i sar., 2017). Autori su ovakav nalaz podjednake dužine trajanja protumačili povoljnijom manipulacijom mekih tkiva (dura mater i periorbitalna meka tkiva) piježohirurškim pristupom, kao i boljim hemostatskim efektom u toku piježohirurških osteotomija za razliku od standardnog pristupa.

U ovoj doktorskoj disertaciji, podjednaka dužina trajanja piježohirurških i standardnih hirurških komplikovanih ekstrakcija kod zdravih pacijenta, uprkos prolongiranom trajanju osteotomije i odontotomije može biti obrazložena prednostima mikrometričkog piježohirurškog sečenja u odnosu na standardni pristup, a to su preciznost i bolja taktilna intraoperativna kontrola vrha instrumenta u toku rada (Stubinger S i sar., 2008). Naime, za razliku od svrdala kojima u toku standardnog pristupa nije moguće imati uvid o dejstvu između koštanog i mekog tkiva, piježohirurgija, zahvaljujući svojem selektivnom sečenju, ostvaruje efekat samo na mineralizovanom koštanom tkivu bez uticaja na okolne mekotkivne strukture (Labanca M i sar., 2008). Štaviše, efekat kavitacije koji se stvara u toku piježohirurške aktivnosti, opisan kao značajan faktor u hemostazi ekstrakcione rane (Spinelli G i sar., 2014), doprinosi ujedno i boljoj vizuelizaciji hirurške regije i kasnije efektivnijem radu hirurških poluga i klešta prilikom dislokacije i uklanjanja korenova zuba iz koštanih alveola.

Sa druge strane, u grupi DM 2 ispitanika piježohirurške ekstrakcije su značajno duže trajale u odnosu na standardni pristup. Poređenjem piježohirurških osteotomija kod zdravih pacijenata u odnosu na DM 2 pacijente pronađeno je da su piježohirurške osteotomije značajno duže trajale u grupi DM 2 pacijenata. Imajući u vidu

patofiziološke karakteristike koštanog tkiva u DM 2, može se smatrati da povećana mineralna koštana gustina kod ovih pacijenata može predstavljati mogući uzrok znatno dužem trajanju piježohirurških osteotomija. Naime, DM 2 zahvata koštani sistem u uznapredovalim stadijumima oboljenja, gde mnogi faktori kao što su insulinipenija, hiperglikemija, nagomilavanje AGEs produkata, hronična inflamacija, i mikroangiopatije doprinose negativnom uticaju na mikroarhitekturu i biomehaničke karakteristikama u koštanom tkivu (Napoli N i sar., 2017; Napoli N i sar., 2014). Na taj način, za razliku od DM 1, čije se koštano tkivo odlikuje smanjenom mineralnom gustiom, pacijenti oboleli od DM 2 imaju povećanu mineralnu koštanu gustinu, koja je udružena sa rizikom za nastanak koštanih preloma (Vestergaard P i sar., 2007; Hamann C i sar., 2012; Hariri AF i sar., 2019). Imajući ovo u vidu, relevantan je osnov smatrati da razlog znatno dužih piježohirurških osteotomija može biti posledica izmenjenih biomehaničkih karakteristika u koštanom tkivu DM 2 ispitanika i posledičnom znatno dužem trajanju piježohirurških komplikovanih ekstrakcija u odnosu na standardne, za razliku od zdravih pacijenata, gde razlika u dužini trajanja intervencija nije postojala između ispitivanih grupa.

Komplikovane ekstrakcije višekorenih zuba, u ovoj doktorskoj disertaciji, su korištene kao hirurški model u toku kojih se vrši separacija krunice i korenova zuba, uklanjane koštanog tkiva i pravljenje retencionih mesta za aplikaciju poluga, kako bi se, uz što manju hiruršku traumu koštanog i mekog tkiva, izvršila dislokacija i uklanjaje korenova iz alveola (Hupp J, 2014). Najveći broj hirurških protokola u ekstrakcijama zuba obuhvata primenu periotoma, klešta, poluga, apeks elevatora, kao i upotrebu rotirajućih okruglih i fisurnih svrdala sa hirurškim nasadnicima (Wang i sar., 2004; Babbush CA, 2007). Primena rotirajućih svrdala sa hirurškim nasadnicima ima visoko efektivnu aktivnost u smislu sečenja tvrdog zubnog i koštanog tkiva. Međutim, intraoperativna kontrola ovakvih instrumenata je često ograničena i udružena sa postojanjem rizika od neželjenog oštećenja okolnog koštanog i gingivalnog tkiva ekstrakcionih alveola (Babbush CA, 2007, Spinatto S i sar., 2015), koje kasnije može biti praćeno pojavom postoperativnog bola, hiperemije i edema mekotkivnih struktura, kao i posledičnim gubitkom koštanog tkiva (Lago-Mendez L i sar., 2007; Spinato S i sar., 2015). S tim u vezi, tehnika ekstrakcije zuba može se smatrati biološki pogodnom ukoliko se uklanjanje korenova zuba iz alveola može izvesti bez oštećenja okolnog mekog i koštanog tkiva. Ovakva pretpostavka je bila osnov postavljanja hipoteze ispitivanja efekata piježohirurgije, kao minimalno

invazivne hirurške tehnike, na zarastanje ekstrakcionih rana nakon komplikovanih ekstrakcija zuba kod zdravih i pacijenata obolelih od DM 2. Sa tim u vezi, rezultati su ukazali da su piježohirurške komplikovane ekstrakcije višekorenih zuba praćene znatno boljim kliničkim izgledom gingivalnih tkiva postekstrakcione alveole, procenjivanim na osnovu boje gingive, prisustva edema i krvarenja, neposredno nakon hirurške intervencije, kod svih ispitanika, kao i sedmog postoperativnog dana, ali samo u grupi DM 2 pacijenata. Poznato je da piježohirurgija koristi ultasonične vibracije za sećenje koštanog tkiva bez oštećenja okolnih mekotkivnih struktura (Landes CA i sar., 2008). Preciznije, piježohirurške mikrovibracije prouzrokuju selektivno sećenje samo neelastičnog i mineralizovanog koštanog tkiva, za razliku od mekotkivnih struktura, koje ostaju intakte, čak i nakon slučajnog kontakta sa piježohirurškim nastavkom u toku rada. Ovakav protetkivni piježohirurški efekat prema mekotkivnim strukturama je verifikovan na animalnom modelu, gde su autori Otake i sar., pokazali da primena piježohirurgije na površinu jezika miša, ne dovodi do oštećenja epitela i jezičnih papila, za razliku od standardnih okruglih i fisurnih svrdala, koje prosecaju jezik čitavom debljinom, uzrokujući oštećenje svih njegovih tkiva (epitela, submukoze i mišića) (Otake Y i sar., 2018). Klinički izgled gingivalnih tkiva neposredno nakon standardne komplikovane ekstrakcije u ovoj studiji se odlikovao maksimalnim vrednostima, odnosno crvenom bojom gingive, sa prisutnim edemom i krvarenjem na palpaciju. Ovakav nalaz ide u prilog pretpostavci znatno traumatičnijeg standardnog pristupa komplikovane ekstrakcije zuba za razliku od piježohirurškog. Sa tim u vezi, rezultati meta-analize Tsikopoulos i sar., ispitivanjući uticaj piježo i standarnde hirurgije na oštećenja mekih tkiva i postoperativni oporavak pacijenata nakon procedura rinoplastike, zaključili su da su piježohirurške osteotomije bile praćene statistički značajno manje izraženom periorbitalnom ehimozom i edemom tkiva kapka, redukovanim intraoperativnim oštećenjem mekotkivnih struktura, kao i značajno manjim intenzitetom postoperativnog bola u poređenju sa standardnim pristupom (Tsikopoulos A i sar., 2020). Takođe, piježohirurški pristup u ovoj doktorskoj disertaciji je bio praćen značajno intenzivnijim oporavkom kliničkog izgleda mekih tkiva ekstrakcione alveole, kao i intenzivnijem zarastanju u ranom postoperativnom periodu (sedmog u odnosu na treći postoperativni dan), kako u grupi zdravih, tako i u grupi DM 2 ispitanika.

Intenzitet zarastanja postekstrakcione alveole je procenjivan još i pomoću stopa epitelizacije (BO, MD, DA) promera ekstrakcione alveole. Dobijeni rezultati su

pokazali, da je stopa BO epitelizacije u prvih sedam dana, kao i MD epitelizacije od trećeg do sedmog postoperativnog dana bila značajno intenzivnija u DM 2 grupi pacijenata nakon primene standardne hirurgije u odnosu na piježohirurgiju. Imajući u vidu gore navedene karakteristike znatno traumatičnijeg rada rotirajućih svrdala prema gingivalnom i koštanom tkivu i sledstveno izraženijeg edema mekih tkiva, opravdano je smatrati da intenzivnija stopa epitelizacije nakon standardnog pristupa u grupi DM 2 predstavlja upravo rezultat prividno bržeg zatvaranja lumena ekstrakcione alveole, a koje je, ustvari, posledica izraženijeg edema mekih tkiva i posledičnog smanjenja BO i MD dijametra otvora ekstrakcione alveole. Takođe, intenzivnija trauma koštanih zidova ekstrakcionih alveola prilikom standardnog pristupa, može rezultirati izraženijim kolapsom okolnih gingivalnih tkiva, šta takođe doprinosi prividno bržoj stopi epitelizacije u prvih sedam postoperativnih dana nakon primene standardne hirurgije u odnosu na piježohirurgiju. Sa tim u vezi, studija Spinata i sar., je pokazala da su standardne ekstrakcije jednokorenih zuba u gornjoj vilici praćene znatno intenzivnijim smanjenjem bukalne i palatinalne visine grebena, kao i buko-palatinalne širine grebena za razliku od piježohirurških ekstrakcija, ali u nešto dužem observacionom periodu (4 meseca nakon ekstrakcije). Autori su ovakav rezultat pripisali znatno traumatičnije efektu standardnih svrdala na koštanom tkivu. Zapravo, sa biološke tačke gledišta, postoji direktna uzajamna veza između stepana hirurške traume i intenziteta lokalnog inflamatornog odgovora, koji utiče kasnije na proces resorpcije koštanog tkiva (Raghavendra S i sar., 2005). Primena rotirajućih svrdala doprinosi traumatičnom oštećenju kompakte i spongioze viličnih kostiju, koje je verifikovano prisustvom brojnih mikropukotina i debrisom na koštanim zidovima (Simonetti M i sar., 2013). Ovakav fenomen determiniše povećanu inflamaciju, koja nadalje uzrokuje intenzivnije oslobađanje proinflamatornih citokina i dovodi do aktivacije osteoklasta, te sledstveno doprinosi resorpciji koštanog tkiva (Vercellotti i sar., 2005). Upoređivanjem stopa epitelizacije, kao i rezidualnog volumena alveole u toku procesa zarastanja ekstrakcionih alveola između ispitivanih grupa, uočeno je da se najintenzivniji proces zatvaranja alveola, praćen najizraženijim smanjenjem merenih promera, odigrava u prvih sedam dana zarastanja. Ovakav nalaz je u saglasnosti sa rezultatima studije Aronovich i sar., koji su ispitivali uticaj glikemijske kontrole na proces zarastanja alveola nakon rutinskih ekstrakcija zuba kod DM 1 i 2 pacijenata i pronašli da nema značajnosti u stopama epitelizacije između DM pacijenata sa različitim koncentracijama glukoze i vrednostima glikozilisanog hemoglobina

(Aronovich S i sar., 2010). Međutim, autori Aronovich i sar., su ukazali da su stope epitelizacije ekstrakcionih rana bile najintenzivnije u prvih sedam dana, kao da i u drugoj sedmici dolazi do značajnog usporenja u stopi epitelizacije u odnosu na prvih sedam postoperativnih dana.

Komplikovana ekstrakcija višekorenih zuba predstavlja hiruršku intervenciju praćenu bolom umerenog do srednje izraženog intenziteta (Fagade OO, Oginni FO, 2005), koji se u najvećem broju slučajeva klinički kontroliše postekstrakcionom terapijskom primenom analgetika. Ovaj intenzitet bola rezultat je hirurške lokalne traume i sledstvenog oslobađanja medijatora zapaljenja, koji po pravilu prati standardnu hiruršku proceduru. Zapravo, citokini kao što su bradikinin, prostanglandin, faktor rasta nerva, serotonin, adenzin-trifosfat i protoni, stimulišu nociceptore u koštanom tkivu i periodontalnom ligamentu i tako indukuju javljanje bola (Benemei S i sar., 2009). Roque M i sar., su opisali udruženost destrukcije koštanog tkiva sa pojavom bola, ukazujući na činjenicu da je bol rezultat traume koštanog tkiva, kao i da povećavanje koštane traume uzrokuje povećanje intenziteta postoperativnog bola (Roque M i sar., 2003). Međutim pijezohirurški pristup usled selektivnosti i preciznosti sečenja (Rashad A i sar., 2013) doprinosi smanjenju nivoa oslobađanja proinflamatornih citokina (Prete G i sar., 2007), šta se klinički reprezentuje smanjenim intenzitetom bola.

Rezultati ove doktorske disertacije su ukazali na značajno manji intenzitet bola nakon primene pijezohirurgije u odnosu na standardni metod komplikovane ekstrakcije zuba u grupi zdravih i DM 2 pacijenata. Ovakav nalaz je u saglasnosti sa studijama Goyal i sar. i Mantovani i sar. koji su pronašli značajno manji intenzitet bola nakon primene pijezohirurgije u odnosu na standardnu hirurgiju prilikom hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka, ali samo ispitujući efekte na zdravim pacijentima (Goyal M i sar., 2012; Mantovani E i sar., 2014). Sa druge strane, studija Mozzati i sar., na modelu jednostavne ekstrakcije zuba primenom pijezohirurgije i standardne hirurgije, pronašla je da su pijezohirurške ekstrakcije bile praćene manjim intenzitetom bola, ali bez statistički značajne razlike u odnosu na standardnu ekstrakciju (Mozzati M i sar., 2014). Imajući u vidu da je studija Mozzati i sar. imala ukršteni dizajn i da su se obostrane ekstrakcije zuba vršile u istoj seansi, opravdano je smatrati da pacijenti nisu bili u mogućnosti da sa sigurnošću ocene pojavu bola pomoću VAS-a, te i razlika između ispitivanih strana nije imala statističku značajnost. Kada je u pitanju intenzitet postoperativnog bola, koji je u radu

Mozzati i sar. bio podjednak u obe ispitivane grupe, naši rezultati ukazuju na prednosti pijezoelektričnog sečenja koje doprinosi smanjenom bolu nakon primene pijezohirurgije. Takođe, studija Gangwania i sar., koristeći ukršteni dizajn istraživanja kao Mozzati i sar., a ispitujući i upoređujući uticaj pijezohirurgije u odnosu na standardnu metodu alveoplastike u okviru preprotetske pripreme pacijenata za rehabilitaciju zubnim protezama, ukazala je na značajno manji intenzitet bola nakon primene pijezohirurgije prvog postoperativnog dana (Gangwani KD i sar., 2018). Nadalje, Gao i sar., ispitujući efekte pijezohirurškog pristupa u ekstrakcijama prekobrojnih zuba i upoređujući ga sa standardnim pristupom, slično rezultatima ove doktorske disertacije, pronašli su da uprkos značajno dužem trajanju pijezohirurških intervencija, pacijenti su registrovali značajno manji intenzitet bola u poređenju sa standardnim pristupom (Gao Y i sar., 2014).

Imajući u vidu napred pomenute kliničke studije, registrovani manji intenzitet bola nakon pijezohirurgije doprinosi kvalitetnijem postoperativnom oporavku pacijenata, a i kao rezultat u ovoj doktorskoj disertaciji značajno manji broj pacijenata u DM 2 grupi je imao potrebu da uzme analgetik u odnosu na broj onih koji su osetili bol. Takođe, nakon primene standardne hirurgije kod DM 2 pacijenta značajno veći broj pacijenta je imao potrebu da uzme analgetik u odnosu na primenjenu pijezohiruršku tehniku. Bitno je ukazati na interesantan nalaz značajno većeg broja pacijenata u DM 2 grupi koji su osetili bol, nakon primene i pijezohirurgije i standardne hirurgije, u odnosu na grupu zdravih pacijenata. Imajući u vidu DM neuropatiju, kao jednu od najčećih DM mikroangiopatija, razumljivo je da snižen prag tolerancije na bol u grupi DM 2 pacijenata (Morley GK i sar., 1984), predstavlja i razlog značajno većeg broja DM 2 pacijenata koji registrovao bol u odnosu na grupu zdravih. U prilog ovome ide i rezultat vremena uzimanja prvog analgetika koje je bilo značajno duže nakon primene pijezohirurgije u grupi zdravih, dok u grupi DM 2 ispitanika nije bilo značajne razlike u odnosu na standardan metod. Takođe, nije postojala značajnost u broju analgetika uzetih u prvih dvadeset četiri sata između ispitivanih grupa.

U literaturi je pokazano da su teže i dugotrajnije hiruške ekstrakcije udružene sa pojavom intenzivnijeg postoperativnog bola (Lago-Mendez L i sar., 2007). Ovakva tvrdnja je i očekivana, imajući u vidu da je trauma tkiva znatno izraženija kako se povećava nivo težine hirurške ekstrakcije, a bol predstavlja neprijatno senzorno ili emocionalno iskustvo udruženo sa stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva

(Penarrocha M i sar., 2001; Merskey H, 1978). U ovoj studiji nalaz znatno kasnijeg javljanje bola i znatno kasnije potrebe za uzimanjem analgetika nakon primene piježohirurgije u komplikovanim ekstrakcijama može se smatrati posledicom manje traume koštanog i mekog tkiva uzrokovane piježohirurgijom u odnosu na standardni metod komplikovanih ekstrakcija višekorenih zuba. Sa tim u vezi, pokazano je da se oteotomije načinjene svrdlima odlikuju prisustvom hrapavih površina sa mnogobrojnim mikropukotina, prekrivene debrisom i sa koštanim fragmentima, koje za razliku od piježohirurških osteotomije glatkih površina i prekrivenih fibrinom (Gabric Panduric D i sar., 2012; Blaskovic M i sar., 2016), ukazuju na znatno veću traumu koštanog tkiva uzrokovanu standardnim pristupom.

Svakako da je od posebnog kliničkog značaja kvalitet zarastanja hirurške rane meren indeksom zarastanja, koji je u doktorskoj disertaciji pokazao značajno manji stepen hiperemije, krvarenja i eksudacije operativne regije nakon piježohirurgije. Međutim, u pomenutom radu Mozzati i sar. razlika u indeksu zarastanja nije bila značajna, iako su autori okarakterisali piježohirurški pristup da je bio praćen povoljnijim rezultatom zarastanja u smislu očuvanja integriteta koštanih zidova alveola i okolnih mekih tkiva (Mozzati M i sar., 2014). Nadalje, Gangwani i sar., su registrovali značajno bolje i brže zarastanje mekih tkiva hirurške rane nakon piježohirurške alveoplastike. Značajno je istaći da je u gore navedenim studijama zarastanje bilo procenjivano korištenjem istog indeksa zarastanje, prvensveno korištenog u evaluacijama zarastanja nakon mukogingivalnih hirurških procedura (Gangwani KD i sar., 2018; Landry RG i sar., 1988). Sa druge strane, u ovoj doktorskoj disertaciji je po prvi put dat uvid u sve kliničke faktore od značaja za praćenje postoperativnog zarastanja ekstrakcione rane kod komplikovanih vađenja zuba, koje je po pravilu praćeno dužim i komplikovanijim zarastanjem, pa je i samim tim primena piježohirurgije opravdana u ovoj indikaciji.

Savremeni protokoli lečenja pacijenata sa dijabetes melitusom ne obuhvataju pacijente sa oralnohirurškim intervencijama i ne daju relevantne preporuke i sugestije u njihovom stomatološkom lečenju. S tim u vezi, terapijski pristup u oralnohirurškom lečenju pacijenata sa DM do sada je baziran na nekoliko kliničkih prospektivnih i revijalnih radova (Power DJ i sar., 2019; Fernandes KS i sar., 2015; Retzepe M, Donos N, 2010). Ako u obzir uzmemo naučne informacije zasnovane na postoperativnom oporavku pacijenata sa DM nakon ekstrakcija zuba, mogli bi smo da ukažemo na činjenicu da nema statistički značajne razlike u pojavi postoperativnih

komplikacija i kvaliteta zarastanja. Tako na primer Fernandes i sar., kao i Huang i sar., su pokazali da je DM nije praćen pojavom komplikacija nakon ekstrakcija zuba, kao i studija Aronovich i sar., koja je praćenjem samo DM pacijenta nije ukazala na pojavu komplikacija (Fernandes KS i sar., 2015; Huang S i sar., 2013; Aronovich S i sar. 2010).

Dijabetes melitus je urduzen sa brojnim komplikacijama koje se mogu svrstati u makrovaskularne, mikrovaskularne i neuropatske (Rosenberg CS, 1990). Poremećaji u mikrocirkulaciji najvećim delom imaju uticaj u zarastanju rana. Zapravo, intaktna mikrocirkulacija u toku zarastanja rana je osnov za dopremanje tkiva hranljivim materijama, uklanjanje štetnih produkata metabolizma, inflamatornom odgovoru i regulaciji tkivne temperature (Ekmektzoglou KA, Zografos GC, 2006). U dijabetičkim uslovima, promene na kapilarima, kao što su zadebljanje bazalne membrane, doprinose njenoj narušenoj propustljivosti, migraciji leukocita i poremećaju hiperemije, dovodeći do smanjene perfuzije u stanjima stresa i hipoksije u tkivima, sto bi odgovaralo poremećajima metabolizma i zarastanja tkiva nakon hirurške intervencije (Ekmektzoglou KA, Zografos GC, 2006; Lioupis C, 2005). Pomenuti patofiziološki mehanizmi u DM, mogu imati negativni uticaj na ishod hirurških procedura kod pacijenata i biti razlog otežanom zarastanju (Peleg AY i sar., 2007; Jacober SJ, Sowers JR, 1999). Od značaja je ukazati da ovakav klinički nalaz je najvećim delom dokumentovan u procedurama kardiorakalne hirurgije, gde pacijenti koji podležu *by pass* hirurgiji sa loše kontrolisanim DM bivaju suočeni sa povećanim rizikom za nastanak postoperativnog morbiditeta i mortaliteta (Outtara A i sar., 2005), kao i povećane stope za nastankom postoperativnih infekcija rane (Latham R i sar., 2001). Međutim, zbog specifičnosti zarastanja oralnih rana i oralne homeostaze, na čiji uticaj ima funkcija orofacijalne regije, stepen mehaničke traume, prisustvo oralne mikroflore, kao i salive i salivarnih glikoproteina, klinički evidentne razlike u ranoj fazi zarastanja, koja je praćena u našoj studiji nisu bile uočene, pa je stoga i akcenat dat na ćelijske i molekularne mehanizme, kao potencijalne biomarkere u definisanju različitih mehanizama zarastanja kod zdravih i DM pacijenata.

Poznato je da DM 2 nastaje kao posledica poremećaja u sekreciji insulina ili usled njegove smanjene aktivnosti, koji nadalje uzrokuje stanje hiperglikemije u organizmu i posledično dugoročno oštećenje, disfunkciju i poremećaje u različitim tkivima i organima (ADA, 2016). U koštanom tkivu DM 2 dovodi do mehaničkih, histoloških, ćelijskih i molekularnih poremećaja, koji predstavljaju osnov u

patofiziologiji narušene koštane strukture i zarastanja (Retzepi M, Donos N, 2010; Yamaguchi T, 2010; Carnevale V i sar., 2014). Glavni poremećaji, uglavnom nastali kao posledica stvaranja AGEs, obuhvataju poremećaj mineralnih i mehaničkih svojstava u koštanom tkivu, povećan rizik od nastanka preloma, razgradnju kolagena, smanjenu ekspresiju faktora rasta i regulatora diferencijacije osteoblasta, poremećaje u angiogenezi i neovaskularizaciji, kao i pojačanu diferencijaciju i aktivnost osteoklasta usled indukcije stvaranja molekula koji vode koštanoj resorpciji (Einhorn TA i sar., 1988; Blakytyn R i sar., 2011; Coords M i sar., 2011). Mehanizmi odgovorni za oštećenje endotela u DM su usko uslovljeni povećanim oslobađanjem hiperglikemijom indukovanim slobodnim kiseoničnim radikalima (ROS) poreklom iz mitohondrija, kao i posledičnim poremećajem u ROS homeostazi i inaktivaciji antioksidativnog odgovora, koji su zaduženi u kontroli oslobađanja radikala u stanjima stresa. ROS su prirodni krajnji produkti transportnog elektronskog lanca i nastaju redukcijom molekula kiseonika ili oksidacijom molekula vode, a obuhvataju superoksidni anion (O_2^-), hidrogen peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal (OH). Njihova intenzivna akumulacija u toku endogenih metaboličkih procesa ili narušeno uklanjanje može poremetiti redoks ravnotežu i tako uzrokovati oštećenja na DNK molekulima (Nishikawa T i sar., 2000). Sa druge strane, enzimi antioksidativne zaštite, imaju osnovnu ulogu u suprostanavljanju oksidativnom stresu nastalom kao posledica hiperglikemije u DM 2 (La Sala L i sar., 2018)

Epigenetski mehanizmi sa svojim target genima, uključeni u regulisanju genske ekspresije i sledstvene sinteze signalnih molekula odgovornih u međucelijskoj komunikaciji, pokazano je da su pod kontrolom različitih metaboličkih stimulusa, uključujući i nivo glukoze u stanjima DM 2 (Kato M i sar., 2013). Takođe, epigenetska kontrola je od neprocenjive važnosti u fiziologiji međucelijske komunikacije u procesima angiogeneze i osteogeneze procesa zarastanja. Sa tim u vezi, stanja DM hiperglikemije doprinose značajnom narušavanju ekspresije miR-a u cirkulatornim endotelnim mikropartikulama, koji igraju značajnu ulogu u očuvanju vaskularnog zdravlja i predijabetesu (Jansen F i sar., 2016). Štaviše, molekule miR-a bi mogli biti važni modulatori antioksidativnih signalnih puteva, jer poremećaji u antioksidativnom sistemu u stanjima hiperglikemije zapravo čine osnovu u patofiziologiji oštećenja na ćelijskom nivou u DM 2 (La Sala L i sar., 2016).

Postoje podaci u naučnoj literaturi o krucijalnoj ulozi molekula miR-21 u patogenezi metaboličkih oboljenja, kao što je DM (Krichevsky AM i sar., 2009;

Zarjou A i sar., 2011; Chau BN i sar., 2012). Rezultati ove studije su pokazali da je ekspresija molekula miR-21 bila statistički značajno povećana u uzorcima alveolarne kosti DM 2 pacijenata u odnosu na grupu zdravih pacijenata nakon primene i piježohirurgije i standardne hirurgije. Ovakav nalaz je u saglasnosti sa rezultatima studije La Sala i sar., koji su pronašli da endotelne ćelije humanih umbilikalnih vena, nakon izlaganja povećanju i oscilacijama u koncentraciji glukoze, su bile praćene povećanjem ekspresijom miR-21 i stvaranjem ROS, ukazujući, na taj način, na usku povezanost između miR-21 i stanja hiperglikemije. Štaviše, autori La Sala i sar., su dodatno ukazali na štetne efekte miR-21 u stanjem hiperglikemije, koji se pre svega odnose na poremećaje u funkciji enzima SOD 2, glavnog predstavnika antioksidativne zaštite, udružene sa mitohondrijalnom disfunkcijom (La Sala i sar., 2018). Zapravo, u svojoj studiji La Sala i sar., su pokazali da je ekspresija miR-21 udružena sa inhibicijom specifičnih glukozom-indukovanih signalnih puteva, koji dovode do smanjenja ekspresije i aktivacije SOD 2 enzima i tako suprimiraju antioksidativnu zaštitu, prouzrokujući akumulaciju ROS i sledstvenu mitohondrijalnu disfunkciju. Sa druge strane, ovi autori su dodatno ukazali da supresija gena za miR-21 dovodi do smanjenja u stvaranju ROS, kao i povećanju u SOD 2 antioksidativnom odgovoru (La Sala i sar., 2018). Rezultati naše studije nisu ukazali na postojanje statistički značajne razlike u aktivnosti SOD enzima između zdravih i DM 2 pacijenata, kao ni između primenjenih hirurških tehnika u uzorcima koštanog tkiva uzetim u toku komplikovanih ekstrakcija zuba. Imajući u vidu nalaz studije La Sala i sar., opravdano je smatrati da nepostojanje razlike u aktivnosti SOD enzima između zdravih i DM 2 pacijenata je verovatno rezultat znatno veće ekspresije miR-21 i sledstvenog narušavanja ROS homeostaze u DM 2 grupi, koji vodi posledičnom iscrpljenju sistema antioksidativne zaštite usled akumulacije ROS, te je i aktivnost SOD enzima u ovoj studiji bila nešto povećana u DM 2 grupi, ali bez značajnosti u odnosu na grupu zdravih pacijenata.

Kako smo ukazali na patofiziološki fenomen dijabetičnih mikro i makrovaskularnih disfunkcija, jedan od praćenih parametara ćelijskog odgovora, VEGF, je pokazao statistički značajno smanjenu koncentraciju u koštanom tkivu DM 2 pacijenata u odnosu na tkivo zdravih pacijenata, nezavisno od primenjenih hirurških tehnika. Ovakav nalaz je u saglasnosti sa podacima iz stručne literature koji ukazuju da je, angiogeneza, kao krucijalna faza koštane regeneracije, često narušena u stanju DM. Sa tim u vezi, na modelu kritičnog defekta kalvarije miša, angiogeneza je

bila poremećena u stanjima DM 1, ukazujući na štetan efekat DM na proces angiogeneze u toku zarastanja koštanih fraktura (Santana RB i sar., 2003). Štaviše, smanjena ekspresija VEGF proteina je takođe smatrana osnovom poremećaja angiogeneze na animalnom DM 1 modelu (Gandhi A i sar., 2006). U širem smislu tkivne regeneracije, ukazano je na kompromitovanu angiogenezu na modelu ishemije ekstremiteta genetski modifikovanog DM 2 miša (Amin AH i sar., 2010). Takođe, na istom animalnom modelu lokalna aplikacija VEGFA je pokazano da uzrokuje beneficirajući efekat na angiogenezu u procesima zarastanja rana (Galiano RD i sar., 2004).

Narušeno koštano zarastanje u DM 2 uslovima može biti objašnjeno poremećajima u fazi koštane remodelacije, koja je modulirana signalnim molekulama iz familije MMP i PTEN proteina. Zapravo, MMP-9 i PTEN molekule igraju važne uloge u fazama inflamacije i koštane remodelacije fiziološkog procesa zarastanja, dok u stanjima DM 2 njihova narušenja funkcija može bit relevantan osnov u patogenezi nastanka komplikacija, kao što je i otežano koštano zarastanje. Sa tim u vezi, MMP-9 protein predstavlja osnovu međucelijske komunikacije između inflamatornih i progenitorskih ćelija, čiji je krajnji rezultat homeostaza u sintezi ekstracelularnog matriksa procesa koštane remodelacije (Colnot C i sar., 2003; Vu TH, Werb Z, 2000; Stickens D i sar., 2004; Behonick DJ i sar., 2007; Lieu S i sar., 2011; Dan H i sar., 2009). Štaviše, MMP-9 indirektnim putem učestvuje u kontroli angiogeneze usled regulacije biološke raspoloživosti VEGF proteina (Ortega N i sar., 2010; Vu TH I sar., 1998). Na taj način, MMP-9 učestvuje u modulaciji funkcije važnih faktora rasta kao signalnih molekula, usled kontrole njihovog oslobađanja iz ekstracelularnog matriksa ili regulacijom prostorne distribucije ćelija, koje učestvuju u njihovoj sekreciji (Yu YY i sar., 2010; Wang Q i sar., 2011).

Sa druge strane, PTEN protein učestvuje u kontroli inflamatornog odgovora i procesa koštane resorpcije, pomoću različitih mehanizama regulacije, koji obuhvataju preživljavanje, apoptozu, autofagiju, migraciju i proliferaciju ćelija (C. Bazzichetto i sar., 2019). Pokazano je da regulatorna uloga PTEN proteina u procesu koštane remodelacije je zasnovana na kontroli ekspresije proinflamatornih citokina IL-1, IL-6 i TNF- α (Y. Xiao i sar., 2018). Štaviše, pokazano je da prekomerna ekspresija PTEN molekula je udružena sa inhibicijom inflamatorne faze i aktivnosti osteoklasta na animalnom modelu, ukazujući da PTEN predstavlja kritični mediator inflamatornog odgovora i koštane remodelacije (Fu C, Zhang D, 2019).

Rezultati naše studije su pokazali da je koncentracija MMP-9 proteina bila značajno manja u uzorcima koštanog tkiva DM 2 pacijenata uzetih primenom pijezohirurgije, u odnosu na zdrave pacijente. Takođe, koncentracija ovog molekula nakon primene standardne hirurgije u DM 2 grupi je imala trend smanjene vrednosti, ali bez statistički značajne razlike u odnosu na zdrave pacijente. Ovakav rezultat je u saglasnosti za nalazom studije Wang i sar., koji su na animalnom modelu dijabetične nefropatije pronašli da je mRNA za MMP-9, kao i koncentracija ovog proteina bila statistički značajno smanjena u odnosu na kontrolne životinje (Wang J i sar., 2013). Imajući u vidu činjenicu da je ekspresija gena za sintezu, kao i aktivnost MMP-9 proteina regulisana od strane miR-21, autori Wang i sar., su pronašli da je povećana ekspresija miR-21 molekula na ovom animalnom modelu bila u negativnoj korelaciji sa koncentracijom MMP-9 proteina. Takođe, pokazali su da primena inhibitora miR-21, doprinosi povećanoj ekspresiji gena i sintezi MMP-9 proteina, ukazujući da miR-21 direktno reguliše sintezu MMP-9, kao svog *target* gena (Wang J i sar., 2013). Slično rezultatima studije Wang i sar., u ovoj doktorskoj disertaciji pronađen je značajno veći nivo ekspresije miR-21 u uzorcima koštanog tkiva DM 2 pacijenata u odnosu na zdrave, sa nešto većim nivoom statističke značajnosti nakon primene standardne hirurgije. Imajući u vidu dobijene značajnosti u koncentracija MMP-9 proteina između ispitivanih grupa, sadašnji rezultat može biti objašnjen mehanizmom epigenetske kontrole genske ekspresije MMP-9 ćelijske signalizacije, predvođene miR-21 molekulama, i sledstvene različite sinteze ovog faktora rasta. Nepostojanje značajnosti u koncentracijama MMP-9 proteina nakon primene standardne hirurške tehnike kod DM 2 pacijenata u odnosu na zdrave može se obrazložiti prisutvom većeg nivoa značajnosti u ekspresiji miR-21 molekula u DM 2 grupi nakon standardne tehnike, koji vodi posledičnom intenzivnijoj supresiji genske transkripcije i sledstvene smanjene sinteze MMP-9 proteina, imajući u vidu nalaz studije Wang i sar., odnosno, da je ekspresija miR-21 u negativnoj korelaciji sa koncentracijom MMP-9.

Sa druge strane, stanje hiperglikemije u DM i hronično stvaranje ROS mogu dovesti do indukovanja ekspresije PTEN-a (Kang KH i sar., 2009; Song P i sar., 2007). Sa tim u vezi, Mocanu i saradnici su ukazali na povećan nivo PTEN-a na srčanom modelu Goto-Kakizaki miša i tako zaključili da DM može biti udružen sa povećanjem niva PTEN proteina (Mocanu MM i sar., 2006).

Rezultati ove studije su pokazali da je koncentracija PTEN-a bila statistički značajno veća u uzorcima alveolarne kosti DM 2 pacijenta u odnosu na zdrave

pacijente, bez obzira na primenjenu hiruršku tehniku komplikovane ekstrakcije zuba. Ovakav rezultat je u saglasnosti sa nalazom studije Wang i sar., koji su kod DM 2 pacijenata nakon by pass hirurgije koronarnih arterija, pronašli da je ekspresija PTEN proteina bila značajno veća u odnosu na zdrave pacijente (Wang B i sar., 2011). Štaviše, autori Wang i sar., su ovakav nalaz obrazložili činjenicom da hiperglikemija i povećan oksidativni stres u DM uslovima doprinose nastanku poremećaja u PTEN-Akt ćelijskoj signalizaciji, koji nadalje čine biološki osnov u mehanizmu oštećenja srčanog mišića kod DM pacijenata (Wang B i sar., 2011).

Na molekularnom nivou aktivnost PTEN-a je pod epigenetskom kontrolom molekula iz miR familije i pokazano je da u uslovima povećane koncentracije glukoze, miR-21 doprinosi smanjenju ekspresije PTEN-a u mezanglijskim ćelijama bubrega (Dey N i sar., 2011). Suprotno ovoj tvrdnji, rezultati naše studije su pokazali da je uprkos povećanom nivou ekspresije miR-21 molekula u konstantnom tkivu DM 2 pacijenata, koncentracija PTEN-a, takođe bila statistički značajno veća u odnosu na zdrave pacijente.

Imajući u vidu antidijabetičnu terapiju metforminom, koju su u ovoj studiji pacijeti koristili u kontroli DM 2, kao i njen povoljni uticaj na sintezu PTEN-a (Luo M i sar., 2017), rezultati su pokazali značajno veću koncentraciju ovog proteina u DM 2 grupi u odnosu na zdrave pacijente, uprkos nalazu značajno veće ekspresije miR-21, takođe u DM 2 grupi pacijenata. Konačno, pokazano je da biguanidinski lekovi, kao što je metformin utiču povoljno u metabolizmu koštanog tkiva kod pacijenata obolelih od DM 2. Metformin svoj hipoglikemijski efekat ostvaruje smanjenjem sinteze glukoze u jetri, kao i povećanje osetljivosti perifernih tkiva na insulin (Krentz AJ, Bailey CJ, 2005). Zapravo, svoj beneficirajući efekat u koštanom tkivu ovi lekovi ostavaruju delovanjem na diferencijaciju ostoblasta i osteoklasta, stimulišući stvaranje osteoprotežerina (OPG), kao i smanjenjem ekspresije RANKL-a. (Mai QG i sar., 2011; Meier C i sar., 2015). Sa tim u vezi, studija Serrao i sar., ispitivajući uloge metformina u poništavanju štetnih efekata hiperglikemije tokom zarastanja koštanog tkiva oko implantata na animalnom modelu, pronašla je da su DM životinje tretirane metforminom imale povišen nivo OPG, kao i smanjen odnos RANKL/OPG u medularnom koštanom tkivu oko tela implantata, za razliku od kontrolnih životinja (Serrao CR i sar., 2017). Takođe, slično rezultatima Serrao i sar., studija Shao i sar., je pronašla da primena metformin u *in vitro* uslovima dovodi do povećane ekspresije OPG u osteoblastima-sličnim ćelijama, kultivisanim u uslovima hiperglikemije (Shao

X i sar., 2014). Štaviše, primena metformina na modelu miša dovodi do inhibicije stvaranja periapikalnih lezija, usled smanjenja odnosa RANKL/OPG (Liu L i sar., 2012), stimulanja ekspresije OPG u osteoblastima, kao i inhibicije diferencijacije osteoklasta i sledstvene prevencije gubitka koštanog tkiva kod miševa sa estrogenskom deficijencijom (Mai QG i sar., 2011). U hematopoetičnim ćelijama, metformin inhibira diferencijaciju osteoklastične loze i prevenira proinflamatorni odgovor makrofaga usled nagomilavanja AGEs u stanjima hiperglikemije (Jang WG i sar., 2011; Chen SC i sar., 2017). Konačno, na animalnom modelu streptozocinom indukovano DM 1, metformin poboljšava angiogene funkcije endotelnih ćelija, aktivacijom AMPK-eNOS signalnog puta (Yu JW i sar., 2016).

Imajući u vidu gore navedene rezultate eksperimentalnih studija, kao i činjenicu da je većina ispitivane DM 2 populacije ove doktorske disertacije koristila metformin u terapiji oboljenja, opravdano je smatrati da beneficirajuća uloga metformina u metabolizmu koštanog tkiva može predstavljati razlog nepostojanja značajnosti u razlici sa kliničkog aspekta (tkivni nivo) u zarastanju eksprakcionih rana između DM 2 i zdravih pacijenata.

ZAKLJUČCI

1. Ukupna dužina trajanja hirurške intervencije i dužina trajanja osteotomije je bila značajno duža primenom pijezohirurgije u odnosu na standardnu hiruršku ekstrakciju impaktiranih umnjaka u donjoj vilici kod zdravih i DM 1 pacijenata, bez značajne razlike u parametrima postoperativnog toka u DM 1 grupi.
2. Pijezohirurška tehnika rezultira značajnim smanjenjem intenziteta postoperativnog bola, značajnim produženjem bezbolnog postoperativnog intervala i kasnijom potrebom za uzimanjem analgetika u odnosu na primenu standardne hirurške tehnike prilikom ekstrakcije impaktiranih umnjaka u donjoj vilici kod zdravih pacijenata.
3. Imajući u vidu kvalitet postoperativnog oporavka zdravih pacijenata posle hirurške ekstrakcije impaktiranih umnjaka u donjoj vilici, trizmus je bio značajno manji posle pijezohirurgije, odnosno značajno veći posle standardne hirurške tehnike trećeg postoperativnog dana. Standardnom hirurškom procedurom trizmus se značajno povećao trećeg u odnosu na prvi postoperativni dan, šta nije bio slučaj nakon primene pijezohirurgije.
4. Na ćelijskom nivou, u toku pijezohirurgije dolazi do značajnog smanjenja nivoa VEGF proteina u alveolarnom koštanom tkivu u odnosu na standardan pristup hirurške ekstrakcije impaktiranih umnjaka u donjoj vilici kod zdravih pacijenata, šta nije bio slučaj sa promenom u nivou IL-1 β proteina i aktivnosti SOD enzima.
5. Na molekularnom nivou, u toku pijezohirurgije dolazi do značajnog povećanja ekspresije molekula miR-21 u alveolarnom koštanom tkivu, u odnosu na standardan pristup hirurške ekstrakcije impaktiranih umnjaka u donjoj vilici kod zdravih pacijenata.
6. Statistički značajna pozitivna korelacija između nivoa ekspresije molekula miR-21 i vremena javljanja prvog postoperativnog bola, prisutna nakon obe primenjene hirurške tehnike, pokazala je značaj definisanja promene u ekspresiji miR-21, kao potencijalnog biomarkera postoperativnih tegoba kod

pacijenata, nakon hirurške ekstrakcije impaktiranih umnjaka u donjoj vilici kod zdravih pacijenata.

7. Prilikom komplikovane ekstrakcije višekorenih zuba u gornjoj vilici prisutno je značajno duže trajanje pijezohirurške osteotomije kod pacijenata obolelih od DM 2 u odnosu na zdrave. Takođe, značajno duže trajajnje osteotomije i odontotomije je registrovano primenom pijezohirurgije u odnosu na standardnu hirurgiju i kod zdravih i kod DM 2 pacijenata.
8. Iako razlike u kvalitetu postoperativnog bola nisu bile prisutne između zdravih i pacijenata sa DM 2, primena pijezohirurgije je značajno smanjila intenzitet postoperativnog bola, kao i značajno prolongirala interval do javljanja bola i uzimnaja postoperativnog analgetika, kako kod zdravih, tako i kod DM 2 pacijenata, nakon komplikovane ekstrakcije višekorenih zuba u gornjoj vilici.
9. Komplikovane ekstrakcije višekorenih zuba u gornjoj vilici su praćene značajno većim brojem pacijenata koji su osetili bol u DM 2 grupi u odnosu na grupu zdravih, nakon primene i pijezohirurgije i standardne hirurgije. U DM 2 grupi, nakon primene pijezohirurgije, značajno manji broj pacijenata je uzeo analgetik u odnosu sa broj pacijenata koji je osetio bol, šta nije bio slučaj nakon primene standardne hirurške tehnike.
10. Odstupanja u kliničkom izgledu gingive ekstrakcione alveole u zarastanju bila su značajna neposredno posle standardne hirurške tehnike u odnosu na pijezohirurgiju, kako kod zdravih, tako i kod DM 2 pacijenata, na modelu komplikovane ekstrakcije višekorenih zuba u gornjoj vilici. Promene u izgledu gingive ekstrakcione alveole, na istom hirurškom modelu, su ukazale da je pijezohirurgija bila praćena značajno intenzivnijim oporavkom u izgledu gingive sedmog u odnosu na treći postoperativni dan, za razliku od standardne tehnike, kako u grupi zdravih, tako i u grupi DM 2 pacijenata.
11. Kada je u pitanju indeks zarastanja ekstrakcionih alveola, sličan trend promene zabeležen je kao i kod promene u kliničkom izgledu gingive ekstrakcione alveole, sa minimalnim početnim razlikama, na modelu

komplikovane ekstrakcije višekorenih zuba u gornjoj vilici kod zdravih i DM 2 pacijenata.

12. Komplikovane ekstrakcije višekorenih zuba u gornjoj vilici kod DM 2 pacijenata su praćene značajnim smanjenjem BO promera u prvih sedam dana, kao i MD promera u periodu od trećeg do sedmog postoperativnog dana, nakon primene standardne hirurgije u odnosu na piježohirurgiju.
13. Na ćelijskom nivou, u toku piježohirurgije dolazi do značajnog smanjena nivoa VEGF, a povećanja nivoa MMP-9 proteina u alveolarnom koštanom tkivu nakon komplikovane ekstrakcije višekorenih zuba u gornjoj vilici kod zdravih pacijenata, šta nije registrovano kod pacijenata obolelih od DM 2. Kod pacijenata sa DM 2, na istom hirurškom modelu, nivo VEGF i MMP-9 proteina je bio statistički značajno niži, dok je nivo PTEN proteina bio značajno povećan u odnosu na grupu zdravih pacijenata, nakon primene i piježo i standardne hirurgije
14. Na molekularnom nivou, u toku standardne i piježohirurgije dolazi do značajnog povećanja ekspresije molekula miR-21 u alveolarnom koštanom tkivu kod pacijenata sa DM 2, u odnosu na zdrave pacijente, na modelu komplikovane ekstrakcije višekorenih zuba u gornjoj vilici.
15. Kod pacijenata sa DM 2 ekspresija molekula miR-21 u alveolarnom koštanom tkivu se nije značajno razlikovala između različitih hirurških pristupa, dok kod zdravih pacijenata, njena vrednost je bila značajno veća nakon primene piježohirurgije, na modelu komplikovane ekstrakcije višekorenih zuba u gornjoj vilici.
16. Dijabetes melitus tip 2 nije značajno menjao kvalitet kliničkog zarastanja postekstrakcione alveole (tkivni nivo), primenom piježo i standardne hirurgije, dok je značajno uticao na promenu u nivou VEGF, MMP-9 i PTEN proteina (ćelijski nivo), kao i povećanje ekspresije molekula miR-21 (molekularni nivo), kada se komplikovana ekstrakcija višekorenih zuba u gornjoj vilici vršila primenom piježohirurgije.

LITERATURA

O'Daly BJ, Morris E, Gavin GP, O'Byrne JM, McGuinness GB. High power low frequency ultrasound: a review of tissue dissection and ablation in medicine and surgery. *J Mater Process Technol* 2008; 200: 38–58. doi:10.1016/j.jmatprotec.2007.11.041

Spinelli G, Lazzeri D, Conti M, Agostini T, Mannelli G. Comparison of piezosurgery and traditional saw in bimaxillary orthognathic surgery. *J Craniomaxillofac Surg* 2014; 42: 1211–1220. doi:10.1016/j.jcms.2014.02.011

Pavlikova G, Foltan R, Horka M, Hanzelka T, Borunska H, Sedy J. Piezosurgery in oral and maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2011; 40: 451–457. doi:10.1016/j.ijom.2010.11.013

Lekholm U, Zarb GA. In: Patient selection and preparation. Tissue integrated prostheses: osseointegration in clinical dentistry. Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T, editor. Chicago: Quintessence Publishing Company; 1985; p. 199–209.

Vercellotti T. Characteristics of Piezosurgery Surgical Instruments. In: Vercellotti T, editor. *Essentials in piezosurgery, Clinical Advantage in Dentistry*. (Chap. 2), Italy: Quintessence Publishing 2009; p. 11-17.

The Free Dictionary [homepage on the Internet]. Available from: <http://www.thefreedictionary.com>. Accessed July 15, 2020.

American Physical Society. This month in physics history: March 1880 – the Curie brothers discover piezoelectricity. 2014. Available from: <http://www.aps.org/publications/apsnews/201403/physicshistory.cfm>. Accessed July 25, 2020.

Catuna MC. Sonic energy: a possible dental application, Preliminary report of an ultrasonic cutting method. *Ann Dent*. 1953; 12: 100–101.

Mazorow HB. Bone repair after experimental produced defects. *J Oral Surg Anesth Hosp Dent Serv*. 1960; 18: 107–115.

McFall TA, Yamane GM, Burnett GW. Comparison of the cutting effect on bone

of an ultrasonic cutting device and rotary burs. *J Oral Surg Anesth Hosp Dent Serv.* 1961; 19: 200–209.

Horton JE, Tarpley TM Jr, Wood LD. The healing of surgical defects in alveolar bone produced with ultrasonic instrumentation, chisel, and rotary bur. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1975; 39: 536–546.

Torrella F, Pitarch J, Cabanes G, Anitua E. Ultrasonic osteotomy for the surgical approach of the maxillary sinus: a technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1998; 13: 697–700.

Vercellotti T. Piezoelectric surgery in implantology: a case report – a new piezoelectric ridge expansion technique. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2000; 20: 358–365.

Y. Gulnihar, H. Huseyin Kosger, Y. Tutar: A comparison of piezosurgery and conventional surgery by heat shock protein 70 expression. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2013; 42: 508–510.

Blus C, Szmukler-Moncler S. Atraumatic tooth extraction and immediate implant placement with Piezosurgery: evaluation of 40 sites after at least 1 year of loading. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2010; 30: 355-363.

Al-Morraissi EA, Elmansi YA, Al-Sharaee YA, Alrmali AE, Alkhutari AS. Does the piezoelectric surgical technique produce fewer postoperative sequelae after lower thirdmolar surgery than conventional rotary instruments? A systematic review and meta analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2016; 45: 383-391. doi: 10.1016/j.ijom.2015.10.005

Lavu V, Arumugam C, Venkatesan N, et al. A Present Day Approach to Crown Lengthening – Piezosurgery. *Cureus* 2019; 11: e6241. DOI 10.7759/cureus.6241

Abella F, de Ribot J, Doria G, Duran-Sindreu F, Roig M. Applications of piezoelectric surgery in endodontic surgery: a literature review. *J Endod.* 2014; 40: 325-332. doi: 10.1016/j.joen.2013.11.014.

Momesso GA, de Sousa CA, de Lima VN, et al. Removal of Compound Odontoma With Piezosurgery Technique. *J Craniofac Surg*. 2017; 28: 584-585. doi:10.1097/SCS.00000000000003103

Scarano A, Carinci F, Lorusso F, et al. Ultrasonic vs Drill Implant Site Preparation: Post-Operative Pain Measurement Through VAS, Swelling and Crestal Bone Remodeling: A Randomized Clinical Study. *Materials (Basel)*. 2018; 11: 2516.. doi:10.3390/ma11122516

Wallace SS, Mazor Z, Froum SJ, Cho SC, Tarnow DP. Schneiderian membrane perforation rate during sinus elevation using piezosurgery: clinical results of 100 consecutive cases. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2007; 27: 413-419.

Sohn DS, Ahn MR, Lee WH, Yeo DS, Lim SY. Piezoelectric osteotomy for intraoral harvesting of bone blocks. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2007; 27: 127–131.

Danza M, Guidi R, Carinci F. Comparison between implants inserted into piezo split and unsplit alveolar crests. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67: 2460–2465.

Marini, E., Cisterna, V., Messina, A. M. The removal of a malpositioned implant in the anterior mandible using piezosurgery. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 2013; 115: e1–e5. doi:10.1016/j.oooo.2011.10.031

Bovi M, Manni A, Mavriqi L, Bianco G, Celletti R. The use of piezosurgery to mobilize the mandibular alveolar nerve followed immediately by implant insertion: a case series evaluating neurosensory disturbance. *Int J Periodontics Restor Dent* 2010; 30: 73–81.

De Vicente JC, Pena I, Brana P, Hernandez-Vallejo G. The use of piezoelectric surgery to lateralize the inferior alveolar nerve with simultaneous implant placement and immediate buccal cortical bone repositioning: a prospective clinical study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2016; 45: 851-857.

Sakkas, N., Otten, J.E., Gutwald, R., Schmelzeisen, R. Transposition of the mental nerve by piezosurgery followed by postoperative neurosensory control: A case report. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2008; 46: 270–271. doi:10.1016/j.bjoms.2007.06.005

Spinelli G, Mannelli G, Zhang YX, Lazzeri D, Spacca B, Genitori L, Raffaini M, Agostini T. Complex craniofacial advancement in paediatric patients: Piezoelectric and traditional technique evaluation. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 2015; 43: 1422–1427. doi:10.1016/j.jcms.2015.07.012

Pagotto LEC, de Santana Santos T, de Vasconcellos SJA, Santos JS, Martins-Filho PRS. Piezoelectric versus conventional techniques for orthognathic surgery: Systematic review and meta-analysis. *J Craniomaxillofac Surg*. 2017; 45: 1607-1613. doi:10.1016/j.jcms.2017.06.011

Crosetti E, Battiston B, Succo G. Piezosurgery in head and neck oncological and reconstructive surgery: personal experience on 127 cases. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2009; 29: 1–9.

Spinelli, G., Valente, D., Mannelli, G., Raffaini, M., Arcuri, F. Surgical management of ankyloses of the temporomandibular joint by a piezoelectric device. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 2017; 45: 441–448. doi:10.1016/j.jcms.2016.12.004

Labanca M, Azzola F, Vinci R, Rodella LF. Piezoelectric surgery: twenty years of use. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2008; 46: 265–269.

Vercellotti T, Crovace A, Palermo A, Molfetta A. The piezoelectric osteotomy in orthopedics: clinical and histological evaluations (pilot study in animals). *Mediterranean J Surg Med*. 2001; 9: 89–95.

Stubinger S, Landes C, Seitz O, Zeilhofer HF, Sader R. Ultrasonic bone cutting in oral surgery: a review of 60 cases. *Ultraschall Med*. 2008; 29: 66–71.

Claire S, Lea SC, Walmsley AD. Characterisation of bone following ultrasonic cutting. *Clin Oral Investig* 2013; 17: 905–912. doi:10.1007/s00784-012-0754-9

Maurer P, Kriwalsky MS, Veras RB, Vogel J, Syrowatka F, Heiss C. Micromorphometrical analysis of conventional osteotomy techniques and ultrasonic osteotomy at the rabbit skull. *Clin. Oral Impl. Res.* 2008; 19: 570–575 doi: 10.1111/j.1600-0501.2007.01516.x

Hollstein S, Hoffmann E, Vogel J, Heyroth F, Prochnow N, Maurer P. Micromorphometrical analyses of five different ultrasonic osteotomy devices at the rabbit skull. *Clin. Oral Impl. Res.* 2012; 23: 713-718. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02185.x.

Blaskovic, M., Gabrić, D., Coleman, N. J., Slipper, I. J., Mladenov, M., Gjorgievska, E. Bone Healing Following Different Types of Osteotomy: Scanning Electron Microscopy (SEM) and Three-Dimensional SEM Analyses. *Microscopy and Microanalysis.* 2016; 22: 1170–1178. doi:10.1017/s1431927616011971

Alam K, Mitrofanov AV, Silberschmidt VV. Experimental investigations of forces and torque in conventional and ultrasonically-assisted drilling of cortical bone. *Med Eng Phys.* 2011; 33: 234-239.

Alam K, Khan M, Silberschmidt VV. Analysis of forces in conventional and ultrasonically assisted plane cutting of cortical bone. *P I Mech Eng H-J Eng Med.* 2013; 227: 636-642.

Hennet P. Piezoelectric bone surgery: a review of the literature and potential applications in veterinary oromaxillofacial surgery. *Front. Vet. Sci.* 2015; 2: 8. doi: 10.3389/fvets.2015.00008

Landes CA, Stübinger S, Rieger J, Williger B, Ha TK, Sader R. Critical evaluation of piezoelectric osteotomy in orthognathic surgery: operative technique, blood loss, time requirement, nerve and vessel integrity. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66: 657–674. doi:10.1016/j.joms.2007.06.633

Lucas M, Mathieson A. Ultrasonic cutting for surgical applications. In: Gallego-Juarez JA, Graff KF, editors. *Power Ultrasonics.* (Chap. 23), Cambridge: Wood-

head Publishing, Elsevier 2015; p. 695–721.

Yaman Z, Suer BT. Piezoelectric surgery in oral and maxillofacial surgery. *Annals of Oral & Maxillofacial Surgery* 2013; 1: 5.

Walsh LJ. Piezosurgery: an increasing role in dental hard tissue surgery. *Austral Dent Pract* 2007; 9: 52-56.

Rahnama M, Czupkałło L, Czajkowski L, Graszka J, Wallner J. The use of piezosurgery as an alternative method of minimally invasive surgery in the authors' experience. *Wideochir Inne Tech Maloinwazyjne*. 2013; 8: 321-326. doi: 10.5114/wiitm.2011.35144.

Chang, H.H., Lee, M.S., Hsu, Y.C., Tsai, S.J., Lin, C.P. Comparison of clinical parameters and environmental noise levels between regular surgery and piezosurgery for extraction of impacted third molars. *Journal of the Formosan Medical Association*, 2015; 114: 929–935. doi:10.1016/j.jfma.2014.02.003

Maglione M, Bevilacqua L, Dotto F, Costantinides F, Lorusso F, Scarano A. Observational Study on the Preparation of the Implant Site with Piezosurgery vs. Drill: Comparison between the Two Methods in terms of Postoperative Pain, Surgical Times, and Operational Advantages. *Biomed Res Int*. 2019; 29: 2019:8483658. doi: 10.1155/2019/8483658.

N. Altıparmak, S.S. Soydan, S. Uçkan: The effect of conventional surgery and piezoelectric surgery bone harvesting techniques on the donor site morbidity of the mandibular ramus and symphysis. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2015; 44: 1131–1137.

Jordi C, Mukaddam K, Lambrecht JT, Kuhl S. Membrane perforation rate in lateral maxillary sinus floor augmentation using conventional rotating instruments and piezoelectric device-a meta-analysis. *Int J Implant Dent*. 2018; 4: 3. doi: 10.1186/s40729-017-0114-2.

Mouraret S, Houschyar KS, Hunter DJ, Smith AA, Jew OS, Girod S, Helms JA. Cell viability after osteotomy and bone harvesting: comparison of piezoelectric surgery and conventional bur. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014; 43: 966-971. doi: 10.1016/j.ijom.2013.11.018.

Otake Y, Nakamura M, Henmi A, Takahashi T, Sasano Y. Experimental Comparison of the Performance of Cutting Bone and Soft Tissue between Piezosurgery and Conventional Rotary Instruments. *Sci Rep*. 2018;8(1):17154. doi:10.1038/s41598-018-35295-6

Pereira CCS, Batista FRS, Jacob RGM, et al. Comparative Evaluation of Cell Viability Immediately After Osteotomy for Implants With Drills and Piezosurgery: Immunohistochemistry Analysis. *J Craniofac Surg*. 2018; 29: 1578-1582. doi:10.1097/SCS.0000000000004542

Harder S, Wolfart S, Mehl C, Kern M. Performance of ultrasonic devices for bone surgery and associated intraosseous temperature development. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009; 24: 484-490.

Moradi Haghgoo J, Arabi SR, Hosseinipanah SM, Solgi G, Rastegarfar N, Farhadian M. Comparison of the effect of three autogenous bone harvesting methods on cell viability in rabbits. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2017; 11: 73-77. doi:10.15171/joddd.2017.014

Giraud JY, Villemin S, Darmana R, Cahuzac JP, Autefage A, Morucci JP: Bone cutting. *Clin Phys Physiol Meas* 1991; 12: e1-e19,

Tehemar SH. Factors affecting heat generation during implant site preparation: a review of biologic observations and future considerations. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999; 14: 127-136.

Gabric Panduric D, Bago I, Katanec D, Zabkar J, Miletic I, Anic I. Comparison of Er:YAG laser and surgical drill for osteotomy in oral surgery: An experimental study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012; 70, 2515–2521.

Panduric DG, Juric IB, Music S, Molčanov K, Sušić M, Anić I. Morphological and ultrastructural comparative analysis of bone tissue after Er:YAG laser and surgical drill osteotomy. *Photomed Laser Surg.* 2014; 32: 401-408. doi: 10.1089/pho.2014.3711.

Vercellotti, T., Nevins, M.L., Kim, D.M., Nevins, M., Wada, K., Schenk, R.K. Fiorellini, J.P. Osseous response following resective therapy with piezosurgery. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 2005; 25: 543–549.

Ma L, Stubinger S, Liu XL, Schneider UA, Lang NP. Healing of osteotomy sites applying either piezosurgery or two conventional saw blades: a pilot study in rabbits. *Int Orthop.* 2013; 37: 1597-1603. doi:10.1007/s00264-013-1908-3

Yang BE, Girod S. Efficacy of bone healing in calvarial defects using piezoelectric surgical instruments. *J Craniofac Surg.* 2014; 25: 149-153. doi:10.1097/SCS.0000000000000382

Preti G, Martinasso G, Peirone B, et al. Cytokines and growth factors involved in the osseointegration of oral titanium implants positioned using piezoelectric bone surgery versus a drill technique: a pilot study in minipigs. *J Periodontol.* 2007; 78: 716-722. doi:10.1902/jop.2007.060285

Metzger MC, Bormann KH, Schoen R, Gellrich NC, Schmelzeisen R. Inferior alveolar nerve transposition--an in vitro comparison between piezosurgery and conventional bur use. *J Oral Implantol.* 2006; 32: 19-25. doi:10.1563/1548-1336(2006)32[19:IANTIV]2.0.CO;2

Schaeren S, Jaquier C, Heberer M, Tolnay M, Vercellotti T, Martin I. Assessment of nerve damage using a novel ultrasonic device for bone cutting. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66: 593–596. doi:10.1016/j.joms.2007.03.025

Pavlikova G., R. Foltan, M. Burian, E. Horka, S. Adamek, A. Hejcl, T. Hanzelka, J. Sedy. Piezosurgery prevents brain tissue damage: an experimental study on a new rat model. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2011; 40: 840–844.

Stoetzer M, Felgentrager D, Kampmann A, Schumann P, Rucker M, Gellrich NC, von See C. Effects of a new piezoelectric device on periosteal microcirculation after subperiosteal preparation. *Microvasc Res* 2014; 94: 114-118. doi:10.1016/j.mvr.2014.06.003

Barone A, Marconcini S, Giacomelli L, Rispoli L, Calvo JL, Covani UA. Randomized clinical evaluation of ultrasound bone surgery versus traditional rotary instruments in lower third molar extraction. *J Oral Maxillofac Surg* 2010; 68: 330–336. doi:10.1016/j.joms.2009.03.053

Rashad A, Sadr-Eshkevari P, Heiland M, Smeets R, Prochnow N, Hoffmann E, et al. Practitioner experience with sonic osteotomy compared to bur and ultrasonic saw: a pilot in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2015; 44: 203–208. doi:10.1016/j.ijom.2014.09.004

Anesi A, Ferretti M, Cavani F, et al. Structural and ultrastructural analyses of bone regeneration in rabbit cranial osteotomy: Piezosurgery versus traditional osteotomes. *J Craniomaxillofac Surg*. 2018; 46: 107-118. doi:10.1016/j.jcms.2017.10.004

Beziat JL, Bera JC, Lavandier B, Gleizal A. Ultrasonic osteotomy as a new technique in craniomaxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007; 36: 493–500. doi:10.1016/j.ijom.2007.01.012

Aly, L. A. A.. Piezoelectric surgery: Applications in oral & maxillofacial surgery. *Future Dental Journal* 2018. doi:10.1016/j.fdj.2018.09.002

Gomez G, Jara F, Sánchez B, Roig M, Duran-Sindreu F. Effects of piezoelectric units on pacemaker function: an in vitro study. *J Endod*. 2013; 39: 1296-1299. doi:10.1016/j.joen.2013.06.025

Loots MA, Lamme EN, Mekkes JR, Bos JD, Middelkoop E: Cultured fibroblasts from chronic diabetic wounds on the lower extremity (noninsulin-dependent diabetes mellitus) show disturbed proliferation. *Arch Dermatol Res* 1999; 291: 93–99.

Bates DO, Jones RO. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds*. 2003; 2: 107-120. doi:10.1177/1534734603256626

Drinkwater SL, Smith A, Sawyer BM, Burnand KG. Effect of venous ulcer exudates on angiogenesis in vitro. *Br J Surg* 2002; 89: 709-713.

Folkman, J.; Brem, H. Angiogenesis and inflammation. In: Gallin, J.; Goldstein, I.; Snyderman, R., editors. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Vol. 2. New York: Raven Press;1992. p. 821-839.

Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res*. 2009; 153: 347-358. doi:10.1016/j.jss.2008.04.023

Christopher A. Squier, Michael W. Finkelstein, Oral Mucosa. In Antonio Nanci *Oral Histology*, Mosby, 1998; 239-376.

Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998; 355: S7-S21.

Sandberg MM, Aro HT, Vuorio EI. Gene expression during bone repair. *Clin Orthop Rlat Res* 1993; 289: 292-312.

Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011; 42: 551-555.

Duan X, Bradbury SR, Olsen BR, Berendsen AD. VEGF stimulates intramembranous bone formation during craniofacial skeletal development. *Matrix Biol*. 2016; 52-54: 127-140. doi:10.1016/j.matbio.2016.02.005

Waki T, Lee SY, Niikura T, et al. Profiling microRNA expression during fracture healing. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016; 17: 83. doi:10.1186/s12891-016-0931-0

Banerjee J, Sen CK. microRNA and Wound Healing. *Adv Exp Med Biol.* 2015; 888: 291-305. doi:10.1007/978-3-319-22671-2_15

Schipani E, Maes C, Carmeliet G, Semenza GL. Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF. *J Bone Mineral Res* 2009; 24: 1347-1353.

Sen CK, Roy S. Redox signals in wound healing. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1780: 1348-1361. doi:10.1016/j.bbagen.2008.01.006

Wauquier F, Leotoing L, Coxam V, Guicheux J, Wittrant Y. Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends Mol Med.* 2009; 15: 468-477.

Olejniczak M, Kotowska-Zimmer A, Krzyzosiak W. Stress-induced changes in miRNA biogenesis and functioning. *Cell Mol Life Sci.* 2018; 75: 177–191. doi:10.1007/s00018-017-2591-0

Leung AK, Sharp PA. MicroRNA functions in stress responses. *Mol Cell.* 2010; 40: 205–215. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.027

Cheng Y, Liu X, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C. MicroRNA-21 protects against the H₂O₂-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4. *J Mol Cell Cardiol.* 2009; 47: 5-14. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.01.008

Li CL, Xu ZB, Fan XL, Chen HX, Yu QN, Fang SB, Wang SY, Lin YD, Fu QL. MicroRNA-21 Mediates the Protective Effects of Mesenchymal Stem Cells Derived from iPSCs to Human Bronchial Epithelial Cell Injury Under Hypoxia. *Cell Transplant.* 2018; 27: 571-583. doi: 10.1177/0963689718767159

Zhang T, Ni S, Luo Z, Lang Y, Hu J, Lu H. The protective effect of microRNA-21 in neurons after spinal cord injury. *Spinal Cord.* 2019; 57: 141-149. doi: 10.1038/s41393-018-0180-1

Permenter MG, McDyre BC, Ippolito DL, Stallings JD. Alterations in tissue microRNA after heat stress in the conscious rat: potential biomarkers of organ-specific injury. *BMC Genomics*. 2019; 20: 141. doi: 10.1186/s12864-019-5515-6

Tahamtan A, Teymoori-Rad M, Nakstad B, Salimi V. Anti-Inflammatory MicroRNAs and Their Potential for Inflammatory Diseases Treatment. *Front Immunol*. 2018; 9: 1377. doi:10.3389/fimmu.2018.01377

Chang YF, Hsu YC, Hung HF, Lee HJ, Lui WY, Chi CW, Wang JJ. Quercetin induces oxidative stress and potentiates the apoptotic action of 2-methoxyestradiol in human hepatoma cells. *Nutr Cancer*. 2009; 61: 735-745. doi: 10.1080/01635580902825571

Li P, Wang G, Zhang XL, He GL, Luo X, Yang J, Luo Z, Shen TT, Yang XS. MicroRNA-155 Promotes Heat Stress-Induced Inflammation via Targeting Liver X Receptor α in Microglia. *Front Cell Neurosci*. 2019; 13: 12. doi.org/10.3389/fncel.2019.00012

Toldo S, Das A, Mezzaroma E, Chau VQ, Marchetti C, Durrant D, Samidurai A, Van Tassell BW, Yin C, Ockaili RA, Vigneshwar N, Mukhopadhyay ND, Kukreja RC, Abbate A, Salloum FN. Induction of microRNA-21 with exogenous hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemic and inflammatory injury in mice. *Circ Cardiovasc Genet* 2014; 7: 311-320. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.113.000381

Chen N, Sui BD, Hu CH, Cao J, Zheng CX, Hou R, Yang ZK, Zhao P, Chen Q, Yang QJ, Jin Y, Jin F. MicroRNA-21 Contributes to Orthodontic Tooth Movement. *J Dent Res* 2016; 95: 1425-1433. doi: 10.1177/0022034516657043

Bartel, D.P. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136: 215–233.

Huntzinger, E., Izaurralde, E. Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* 2011; 12: 99–110.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* 2009; 11: 228-234. doi:10.1038/ncb0309-228

Magenta A, Greco S, Gaetano C, Martelli F. Oxidative stress and microRNAs in vascular diseases. *Int J Mol Sci.* 2013; 14: 17319-17346.

Uchida K, Uchida S, Nitta K, Yumura W, Marumo F, Nihei H. Glomerular endothelial cells in culture express and secrete vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol* 1994; 266: F81–F88.

Namiki A, Brogi E, Kearney M, et al. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 31189–31195.

Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 1994; 90: 649–652.

Stavri GT, Zachary IC, Baskerville PA, Martin JF, Erusalimsky JD. Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation* 1995; 92: 11–14.

Bates DO, Harper SJ. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vasc Pharmacol* 2002; 39: 225-237.

Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 1998; 77: 956–964.

Gaudry M, Bregerie O, Andrieu V, El Benna J, Pocidalo MA, Hakim J. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood* 1997; 90: 4153–4161.

Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 1992; 3: 211–220.

Stojadinovic OKA, Golinko M, Tomic-Canic M, Brem H. A novel, non-angiogenic mechanism of VEGF: stimulation of keratinocyte and fibroblast migration. *Wound Repair and Regeneration* 2007: A30.

Makinen T, Veikkola T, Mustjoski S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC et al. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migration signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J* 2001; 3: 4762-4773.

Uchida S, Sakai A, Kudo H, Otomo H, Watanuki M, Tanaka M, Nagashima M, Nakamura T. Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats. *Bone* 2003; 32: 491–501. doi:10.1016/S8756-3282(03)00053-X

Berendsen AD, Olsen BR. How vascular endothelial growth factor-A (VEGF) regulates differentiation of mesenchymal stem cells. *J Histochem Cytochem.* 2014; 62: 103-108. doi:10.1369/0022155413516347

Schipani E, Maes C, Carmeliet G, Semenza GL. Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF. *J Bone Miner Res* 2009; 24: 1347–1353.

Yang YQ, Tan YY, Wong R, Wenden A, Zhang LK, Rabie AB. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci* 2012; 4: 64–68.

De Souza Nunes LS, De Oliveira RV, Holgado LA, Nary Filho H, Ribeiro DA, Matsumoto MA. Immunoexpression of Cbfa-1/Runx2 and VEGF in sinus lift procedures using bone substitutes in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2010; 21: 584–590.

Zelzer E, Mamluk R, Ferrara N, Johnson RS, Schipani E, Olsen BR. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development* 2004; 131: 2161–2171. doi:10.1242/dev.01053dev.01053

Zelzer E, Olsen BR. Multiple roles of vascular endothelial growth factor (VEGF) in skeletal development, growth, and repair. *Curr Top Dev Biol* 2005; 65: 169–187. doi:10.1016/S0070-2153(04)65006-X

Soneja A, Drews M, Malinski T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Rep.* 2005; 57: 108-119.

Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003; 83: 835–870.

Schafer M, Werner S. Transcriptional control of wound repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 69–92.

Sen, C. K., Sies, H., Baeuerle, P. A. *Antioxidant and Redox Regulation of Genes*, Academic Press, San Diego, 2000.

Sen, C. K., Packer, L. *FASEB J.* 1996; 10: 709–720.

Sen, C. K. *Curr. Top. Cell. Reg.* 2000; 36: 1–30.

Sen, C. K. *Biochem. Pharmacol.* 1998; 55: 1747–1758.

Sen, C. K., Khanna, S., Venojarvi, M., Trikha, P., Ellison, E. C., Hunt, T. K., Roy, S. *Am. J. Physiol.* 2002; 282: H1821–H1827.

Khanna, S., Roy, S., Bagchi, D., Bagchi, M., Sen, C. K. *Free Radic.Biol. Med.* 2001; 31: 38–42.

Cho, M., Hunt, T. K., Hussain, M. Z. *Am. J. Physiol.* 2001; 280: H2357–H2363.

American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. Sec. 2. In *Standards of Medical Care in Diabetes*. *Diabetes Care* 2016; 39: S13-S22.

World Health Organization. *Global Report on Diabetes*. Geneva, Switzerland, 2016: World Health Organization.

Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010; 87: 4-14. doi:10.1016/j.diabres.2009.10.007

Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalance coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94: 3171-3182.

Oliveira SF, Guillausseau PJ. Diabetes, advanced glycation end products and vascular disease. *Vasc Med.* 1998; 3: 131-137.

Oguntibeju OO. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2019; 11: 45-63

Giannini C, Mohn A, Chiarelli F, Kelnar CJ. Macrovascular angiopathy in children with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2011; 27: 436-460.

Domingueti CP, Dusse LM, Carvalho Md, de Sousa LP, Gomes KB, Fernandes AP. Diabetes mellitus: The linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. *J Diabetes Complications.* 2016; 30: 738-745. doi:10.1016/j.jdiacomp.2015.12.018

Kessler L, Wiesel ML, Attali P, Mossard JM, Cazenave JP, Pinget M. Von Willebrand factor in diabetic angiopathy. *Diabetes Metab.* 1998; 24: 327-336.

Thallas-Bonke V, Thorpe SR, Coughlan MT, Fukami K, Yap FY, Sourris KC, Penfold SA, Bach LA, Cooper ME, Forbes JM. Inhibition of NADPH oxidative prevents advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C- α -dependent pathway. *Diabetologia* 2008; 57: 460-9.

Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 2010; 107: 1058-1070.

Sena CM, Pereira AM, Seiça R. Endothelial dysfunction – a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochem Biophys Acta.* 2013; 1832: 2216-2231.

Butkowski EG, Jelinek HF. Hyperglycaemia, oxidative stress and inflammation markers. *Redox Rep* 2017; 22: 257-264.

Collier B, Dosssett LA, May AK, Diaz JJ. Glucose control and the inflammatory response. *Nutr Clin Pract* 2008; 23: 3-15.

Bouillon, R. Diabetic bone disease. *Calcified Tissue International* 1991; 49: 155–160.

Salerno M, Argenziano A, Di Maio S, et al. Pubertal growth, sexual maturation, and final height in children with IDDM. Effects of age at onset and metabolic control. *Diabetes Care.* 1997; 20: 721-724. doi:10.2337/diacare.20.5.721

Bizzarri C, Benevento D, Giannone G, et al. Sexual dimorphism in growth and insulin-like growth factor-I in children with type 1 diabetes mellitus. *Growth Horm IGF Res.* 2014; 24: 256-259. doi:10.1016/j.ghir.2014.08.004

Vestergaard, P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes – a meta-analysis. *Osteoporosis International* 2007; 18: 427–444.

Janghorbani, M., Van Dam, R.M., Willett, W.C., Hu, F.B. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *American Journal of Epidemiology* 2007; 166: 495–505.

Cozen, L. Does diabetes delay fracture healing? *Clinical Orthopaedics & Related Research* 1972; 82: 134–140.

Choi WJ, Lee JS, Lee M, Park JH, Lee JW. The impact of diabetes on the short- to mid-term outcome of total ankle replacement. *Bone Joint J.* 2014; 96: 1674-1680. doi:10.1302/0301-620X.96B12.34364

Liuni FM, Rugiero C, Feola M, et al. Impaired healing of fragility fractures in type 2 diabetes: clinical and radiographic assessments and serum cytokine levels. *Aging Clin Exp Res.* 2015; 27: S37-S44. doi:10.1007/s40520-015-0422-4

Janghorbani M, Feskanich D, Willett WC, Hu F. Prospective study of diabetes and risk of hip fracture: the Nurses' Health Study. *Diabetes Care.* 2006; 29: 1573-1578. doi:10.2337/dc06-0440

Loder RT. The influence of diabetes mellitus on the healing of closed fractures. *Clin Orthop Relat Res.* 1988; 232: 210-216.

Bibbo C, Lin SS, Beam HA, Behrens FF. Complications of ankle fractures in diabetic patients. *Orthop Clin North Am.* 2001; 32: 113-133. doi:10.1016/s0030-5898(05)70198-x

Folk JW, Starr AJ, Early JS. Early wound complications of operative treatment of calcaneus fractures: analysis of 190 fractures. *J Orthop Trauma.* 1999; 13: 369-372. doi:10.1097/00005131-199906000-00008

Stuart MJ, Morrey BF. Arthrodesis of the diabetic neuropathic ankle joint. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1990; 253: 209– 211.

Papa J, Myerson M, Girard P. Salvage, with arthrodesis, in intractable diabetic neuropathic arthropathy of the foot and ankle. *J Bone Joint Surg Am.* 1993;75(7):1056-1066. doi:10.2106/00004623-199307000-00012

Tisdell CL, Marcus RE, Heiple KG. Triple arthrodesis for diabetic peritalar neuroarthropathy. *Foot Ankle Int.* 1995; 16: 332-338. doi:10.1177/107110079501600604

Crane JL, Zhao L, Frye JS, Xian L, Qiu T, Cao X. IGF-1 Signaling is Essential for Differentiation of Mesenchymal Stem Cells for Peak Bone Mass. *Bone Res.* 2013; 1: 186–194.

Hough FS, Pierroz DD, Cooper C, Ferrari SL, IOF CSA. Bone and Diabetes Working Group. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Mechanisms and evaluation of bone fragility in type 1 diabetes mellitus. *Eur. J. Endocrinol.* 2016; 174: R127–R138.

Weber DR, Gordon RJ, Kelley JC, Leonard MB, Willi SM, Hatch-Stein J, Kelly A, Kosacci O, Kucheruk O, Kaafarani M, Zemel BS. Poor glycemic control is associated with impaired bone accrual in the year following a diagnosis of type 1 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2019; 104: 4511-4520. doi: 10.1210/jc.2019-00035.

Shah VN, Joshee P, Sippl R, Pyle L, Vigers T, Carpenter RD, Kohrt W, Snell-Bergeon J K. Type 1 diabetes onset at young age is associated with compromised bone quality. *Bone* 2019; 123: 260–264.

Fuusager GB, Christesen HT, Milandt N, Schou A J. Glycemic control and bone mineral density in children and adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr. Diabetes* 2019; 20: 629–636.

Gil-Diaz MC, Raynor J, O'Brien K O, Schwartz G J, Weber D R. Systematic review: associations of calcium intake, vitamin D intake, and physical activity with skeletal outcomes in people with Type 1 diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* 2019; 56: 1091-1102.

Napoli N, Chandran M, Pierroz D D, Abrahamsen B, Schwartz A V, Ferrari S L.

IOF Bone and Diabetes Working Group. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2016; 13: 208–219.

Napoli N, Strollo R, Paladini A, Briganti SI, Pozzilli P, Epstein S. The alliance of mesenchymal stem cells, bone, and diabetes. *Int. J. Endocrinol.* 2014; 2014: 690783.

Weiss RE, Reddi AH. Influence of experimental diabetes and insulin on matrix induced cartilage and bone differentiation. *American Journal of Physiology* 1980; 238: E200–E207.

McCabe LR. Understanding the pathology and mechanisms of type I diabetic bone loss. *Journal of Cellular Biochemistry* 2007; 102: 1343–1357.

Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology* 2003; 144: 346–352.

Macey LR, Kana SM, Jingushi S, Terek RM, Borretos J, Bolander ME. Defects of early fracture-healing in experimental diabetes. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume* 1989; 71: 722–733.

Topping RE, Bolander ME, Balian G. Type X collagen in fracture callus and the effects of experimental diabetes. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1994; 308: 220–228.

Von Wilmsky C, Stockmann P, Metzler P, Harsch IA, Amann K, Schleger KA. Establishment of a streptozotocin-induced diabetic domestic pig model and a systematic evaluation of pathological changes in the hard and soft tissue over a 12-month period. *Clin Oral Implants Res.* 2010; 21: 709-717. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.01914.x

Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31: 509-19.

Bai XC, Lu D, Bai J, Zheng H, Ke ZY, Li XM, Luo SQ. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 314: 197-207.

Chen RM, Wu GJ, Chang HC, Chen JT, Chen TF, Lin YL, Chen TL. 2,6-diisopropylphenol protects osteoblasts from oxidative stress-induced apoptosis through suppression of caspase-3 activation. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1042: 448–459.

Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology.* 2003; 144: 346-352.

Kume S, Kato S, Yamagishi S, Inagaki Y, Ueda S, Arima N, Okawa T, Kojiro M, Nagata K. Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone. *J Bone Miner Res.* 2005; 20: 1647-1658.

Stolzing A, Coleman N, Scutt A. Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells. *Rejuvenation Res.* 2006; 9: 31-35.

Sheweita SA, Khoshhal KI. Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. *Curr Drug Metab.* 2007; 8: 519-525.

Hamada Y, Fujii H, Fukagawa M. Role of oxidative stress in diabetic bone disorder. *Bone* 2009; 45: S35-S38.

Zhen D, Chen Y, Tang X. Metformin reverses the deleterious effects of high glucose on osteoblast function. *J Diabetes Complications*. 2010; 24: 334-344. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2009.05.002.

Waki T, Lee SY, Niikura T, Iwakura T, Dogaki Y, Okumachi E, Oe K, Kuroda R, Kurosaka M. Profiling microRNA expression during fracture healing. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016; 17: 83. doi: 10.1186/s12891-016-0931-0.

Takahara S, Lee SY, Iwakura T, Oe K, Fukui T, Okumachi E, Waki T, Arakura M, Sakai Y, Nishida K, Kuroda R, Niikura T. Altered expression of microRNA during fracture healing in diabetic rats. *Bone Joint Res*. 2018; 7: 139-147. doi: 10.1302/2046-3758.72.BJR-2017-0082.R1.

Barasch A, Safford MM, Litaker MS, Gilbert GH. Risk factors for oral postoperative infection in patients with diabetes. *Spec Care Dentist* 2008; 28:159–166.

Jacober SJ, Sowers JR. An update on perioperative management of diabetes. *Arch Intern Med* 1999; 159: 2405-2411.

Dinh T, Veves A. Microcirculation of the Diabetic Foot. *Curr. Pharm. Des.* 2005; 11: 2301–2309.

Okonkwo UA, DiPietro LA. Diabetes and Wound Angiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2017; 18: pii: E1419. doi: 10.3390/ijms18071419.

Loots MA, Lamme EN, Mekkes JR, Bos JD, Middelkoop E. Cultured fibroblasts from chronic diabetic wounds on the lower extremity (noninsulin-dependent diabetes mellitus) show disturbed proliferation. *Arch Dermatol Res* 1999; 291: 93–99.

Loots MA, Lamme EN, Zeegelaar J, Mekkes JR, Bos JD, Middelkoop E. Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 850–857.

Ferguson MW, Herrick SE, Spencer MJ, Shaw JE, Boulton AJ, Sloan P. The histology of diabetic foot ulcers. *Diabet Med* 1996; Suppl 1: S30–33.

Lim JZ, Ng NS, Thomas C. Prevention and treatment of diabetic foot ulcers. *J R Soc Med* 2017; 110: 104-109.

Huang H, Cui W, Qiu W, Zhu M, Zhao R, Zeng D, Dong C, Wang X, Guo W, Xing W, Li X, Li L, Tan Y, Wu X, Chen L, Fu X, Luo D, Xu X. Impaired wound healing results from the dysfunction of the Akt/mTOR pathway in diabetic rats. *J Dermatol Sci* 2015; 79: 241-251.

Hold GL, El-Omar EM. Genetic aspects of inflammation and cancer. *Biochem J* 2008; 410: 225-235.

Boniakowski AE, Kimball AS, Jacobs BN, Kunkel SL, Gallagher KA. Macrophage-Mediated Inflammation in Normal and Diabetic Wound Healing. *J Immunol.* 2017; 199: 17-24. doi: 10.4049/jimmunol.1700223.

Khanna S, Biswas S, Shang Y, Collard E, Azad A, Kauh C, Bhasker V, Gordillo GM, Sen CK, Roy S. Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PLoS ONE* 2010; 5: e9539.

Seitz O, Schurmann C, Hermes N, Muller E, Pfeilschifter J, Frank S, Goren I. Wound healing in mice with high-fat diet- or ob gene-induced diabetes-obesity syndromes: A comparative study. *Exp. Diabetes Res.* 2010; 2010.

Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N, Bunting S, Steinmetz HG, Gurtner GC. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am. J. Pathol.* 2004; 164: 1935–1947.

Kalluri R, Zeisberg M: Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 392–401.

Rhee S: Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling. *Exp Mol Med* 2009; 41: 858–865.

Yang H, Ganguly A, Cabral F: Inhibition of cell migration and cell division correlates with distinct effects of microtubule inhibiting drugs. *J Biol Chem* 2010; 285: 32242–32250.

Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, Verhaar MC, Braam B, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ: Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 195–199.

Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC: Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 2002; 106: 2781–2786.

Liu ZJ, Velazquez OC. Hyperoxia, endothelial progenitor cell mobilization, and diabetic wound healing. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 1869–1882.

Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, Chen H, Goldstein LJ, Buerk DG, Nedeau A, Thom SR, Velazquez OC. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha. *J Clin Invest* 2007; 117: 1249–1259.

Albiero M, Menegazzo L, Boscaro E, Agostini C, Avogaro A, Fadini GP. Defective recruitment, survival and proliferation of bone marrow-derived progenitor cells at sites of delayed diabetic wound healing in mice. *Diabetologia* 2011; 54: 945–953.

Ozdemir D, Feinberg MW. MicroRNAs in diabetic wound healing: Pathophysiology and therapeutic opportunities. *Trends Cardiovasc Med*. 2019; 29: 131-137. doi: 10.1016/j.tcm.2018.08.002.

Lin CJ, Lan YM, Ou MQ, Ji LQ, Lin SD. Expression of miR-217 and HIF-1 α /VEGF pathway in patients with diabetic foot ulcer and its effect on angiogenesis of diabetic foot ulcer rats. *J Endocrinol Invest.* 2019; 42: 1307-1317. doi: 10.1007/s40618-019-01053-2.

Pell GJ, Gregory BT. Impacted mandibular third molars: classification and modified techniques for removal. *Dent Digest* 1933; 39: 330–338.

Goyal M, Marya K, Jhamb A, Chawla S, Sonoo PR, Singh V, Aggarwal A. Comparative evaluation of surgical outcome after removal of impacted mandibular third molars using a piezotome or a conventional handpiece: a prospective study. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2012; 50: 556–561.

Sivolella S, Berengo M, Bressan E, Di Fiore A, Stellini E. Osteotomy for lower third molar germectomy: randomized prospective crossover clinical study comparing piezosurgery and conventional rotatory osteotomy. *J Oral Maxillofac Surg* 2011; 69: e15-23. doi: 10.1016/j.joms.2010.12.036

Rullo R, Addabbo F, Papaccio G, D'Aquino R, Festa VM. Piezoelectric device vs. conventional rotative instruments in impacted third molar surgery: relationships between surgical difficulty and postoperative pain with histological evaluations. *J Craniomaxillofac Surg* 2013; 41: e33-38. doi: 10.1016/j.jcms.2012.07.007

Sortino F, Pedulla E, Masoli V. The piezoelectric and rotatory osteotomy technique in impacted third molar surgery: comparison of postoperative recovery. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66: 2444-2448. doi: 10.1016/j.joms.2008.06.004

Mantovani E, Arduino PG, Schierano G, Ferrero L, Gallesio G, Mozzati M, Russo A, Scully C, Carossa S. A split-mouth randomized clinical trial to evaluate the performance of piezosurgery compared with traditional technique in lower wisdom tooth removal. *J Oral Maxillofac Surg* 2014; 72: 1890-1897. doi: 10.1016/j.joms.2014.05.002

Brajkovic D, Brkovic B, Milic M, Biocanin V, Krsljak E, Stojic D. Levobupivacaine vs. bupivacaine for third molar surgery: quality of anaesthesia,

postoperative analgesia and local vascular effects. *Clin Oral Investig* 2014; 18: 1481-1488. doi: 10.1007/s00784-013-1114-0

UStun Y, Erdogan O, Esen E, Karsli ED. Comparison of the effects of 2 doses of methylprednisolone on pain, swelling, and trismus after third molar surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96: 535-539.

Schultze-Mosgau S, Schmelzeisen R, Frolich JC, Schmele H. Use of ibuprofen and methylprednisolone for the prevention of pain and swelling after removal of impacted third molars. *J Oral Maxillofac Surg* 1995; 53: 2-7.

Fistarol F, De Stavola L, Fincato A, Bressan E. Mandibular canal position in posterior mandible: anatomical study and surgical considerations in relation to bone harvesting procedures. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2019; 39: e211–e218.

Kammerer PW, Gabriel M, Al-Nawas B, Scholz T, Kirchmaier CM, Klein MO. Early implant healing: promotion of platelet activation and cytokine release by topographical, chemical and biomimetical titanium surface modifications in vitro. *Clin Oral Implants Res* 2012; 23: 504–510.

Mozzati M, Gallesio G, di Romana S, Bergamasco L, Pol R. Efficacy of plasma-rich growth factor in the healing of postextraction sockets in patients affected by insulin-dependent diabetes mellitus. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014; 72: 456-462. doi: 10.1016/j.joms.2013.10.010.

Aronovich S, Skope LW, Kelly JP, Kyriakides TC. The relationship of glycemic control to the outcomes of dental extractions. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 68: 2955-2961. doi: 10.1016/j.joms.2010.05.006.

Juodzbaly G, Kubilius M. Clinical and Radiological Classification of the Jawbone Anatomy in Endosseous Dental Implant Treatment. *J Oral Maxillofac Res.* 2013; 4: e2. doi: 10.5037/jomr.2013.4202.

Gangwani KD, Shetty L, Kulkarni D, Seshagiri R, Chopra R. Piezosurgery versus conventional method alveoloplasty. *Ann Maxillofac Surg* 2018; 8: 181–187.

Miron RJ, Gruber R, Hedbom E, Saulacic N, Zhang Y, Sculean A, Bosshardt DD, Buser D. Impact of bone harvesting techniques on cell viability and the release of growth factors of autografts. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013; 15: 481–489. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2012.00440.x>

Badenoch-Jones EK, David M, Lincoln T. Piezoelectric compared with conventional rotary osteotomy for the prevention of postoperative sequelae and complications after surgical extraction of mandibular third molars: a systematic review and meta-analysis. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2016; 54: 1066-1079. doi: 10.1016/j.bjoms.2016.07.020.

Thomas MV, Puleo DA. Infection, inflammation, and bone regeneration: a paradoxical relationship. *J Dent Res* 2011; 90: 1052-1061. doi: 10.1177/0022034510393967

Akbulut N, Ustuner E, Atakan C, Colok G. Comparison of the effect of naproxen, etodolac and diclofenac on postoperative sequels following third molar surgery: a randomised, double-blind, crossover study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2014; 19: e149-e156.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Pathologic Basis of Disease*. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1999; p. 260-325.

Baqain ZH, Karaky AA, Sawair F, Khraisat A, Duaibis R, Rajab LD. Frequency estimates and risk factors for postoperative morbidity after third molar removal: a prospective cohort study. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66: 2276–2283. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2008.06.047>

Ravikumar KK, Narayanan V, Mathivanan. Prediction of postoperative outcome in mandibular third molar surgery based on preoperative variables: a prospective clinical study. *Int J Soc Rehabil* 2018; 3: 14–23.

Lago-Mendez L, Diniz-Freitas M, Senra-Rivera C, Gude-Sampedro F, Gandara Rey JM, Garcia-Garcia A. Relationships between surgical difficulty and postoperative pain in lower third molar extractions. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65: 979-983.

Garcia Garcia A, Gude Sampedro F, Gandara Rey J, Gallas Torreira M. Trismus and pain after removal of impacted lower third molars. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55: 1223-1226.

Oikarinen K. Postoperative pain after mandibular third-molar surgery. *Acta Odontol Scand* 1991; 49: 7-13.

Berge TI, Boe OE. Predictor evaluation of postoperative morbidity after surgical removal of mandibular third molars. *Acta Odontol Scand* 1994; 52: 162.

Pollmann L: Long-term follow-up of postoperative swelling. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1983; 12: 90.

Capuzzi P, Montebugnoli L, Vacarro MA. Extraction of impacted third molar: A longitudinal prospective study on factors that affect postoperative recovery. *Oral Surg* 1994; 77: 341.

Martini M, Rohrig A, Reich RH, Messing-Jünger M. Comparison between piezosurgery and conventional osteotomy in cranioplasty with fronto-orbital advancement. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017; 45: 395-400. doi:10.1016/j.jcms.2016.12.018

Zizzari VL, Berardi D, Congedi F, Tumedei M, Cataldi A, Perfetti G. Morphological Aspect and iNOS and Bax Expression Modification in Bone Tissue Around Dental Implants Positioned Using Piezoelectric Bone Surgery Versus Conventional Drill Technique. *J Craniofac Surg.* 2015; 26: 741-744. doi:10.1097/SCS.0000000000001540

Robiony M, Polini F, Costa F, Vercellotti T, Politi M. Piezoelectric bone cutting in multipiece maxillary osteotomies. *Oral Maxillofac Surg* 2004; 62: 759-761.

Garg AK. Using the Piezosurgery device: basics and possibilities. *Dent Implantol Update* 2007; 18: 1-4.

Schaller BJ, Gruber R, Merten HA, et al. Piezoelectric bone surgery: a revolutionary technique for minimally invasive surgery in cranial base and spinal surgery? Technical note. *Neurosurgery*. 2005; 57: E410. doi:10.1227/01.neu.0000176700.77461.c9

Leclercq P, Zenati C, Dohan DM. Ultrasonic bone cut part 2: state-of-the-art specific clinical applications. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66:183-188.

Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2008; 14: 179-186. doi: 10.1089/ten.teb.2008.0038

Nakai T, Yoshimura Y, Deyama Y, Suzuki K, Iida J. Mechanical stress up-regulates RANKL expression via the VEGF autocrine pathway in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Mol Med Rep*. 2009 2(2):229-34. doi: 10.3892/mmr_00000088. PMID: 21475817.

Maloney JP, Gao L. Proinflammatory Cytokines Increase Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Alveolar Epithelial Cells. *Mediators Inflamm* 2015; 2015: 387842. doi: 10.1155/2015/387842

Hu K, Olsen BR. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone*. 2016; 91: 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.06.013>

Reinders ME, Sho M, Izawa A, Wang P, Mukhopadhyay D, Koss KE, Geehan CS, Luster AD, Sayegh MH, Briscoe DM. Proinflammatory functions of vascular endothelial growth factor in alloimmunity. *J Clin Invest* 2003; 112: 1655-1665.

Hao Q, Wang L, Tang H. Vascular endothelial growth factor induces protein kinase D-dependent production of proinflammatory cytokines in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; 296: C821-827. doi: 10.1152/ajpcell.00504.2008

Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol* 2010; 28: 321-342. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101311

England H, Summersgill HR, Edey ME, Rothwell NJ, Brough D. Release of interleukin-1 α or interleukin-1 β depends on mechanism of cell death. *J Biol Chem* 2014; 289: 15942-15950. doi: 10.1074/jbc.M114.557561.

Ma X, Becker Buscaglia LE, Barker JR, Li Y. MicroRNAs in NF-kappaB signaling. *J Mol Cell Biol* 2011; 3: 159–166. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjr007>

Wei F, Liu D, Feng C, Zhang F, Yang S, Hu Y, Ding G, Wang S. MicroRNA-21 mediates stretch-induced osteogenic differentiation in human periodontal ligament stem cells. *Stem Cells Dev* 2015; 24: 312-319. doi: 10.1089/scd.2014.0191

Canfran-Duque A, Rotllan N, Zhang X, Fernandez-Fuertes M, Ramirez-Hidalgo C, Araldi E, Daimiel L, Busto R, Fernandez-Hernando C, Suarez Y. Macrophage deficiency of miR-21 promotes apoptosis, plaque necrosis, and vascular inflammation during atherogenesis. *EMBO Mol Med* 2017; 9: 1244-1262. doi: 10.15252/emmm.201607492

Das A, Ganesh K, Khanna S, Sen CK, Roy S. Engulfment of apoptotic cells by macrophages: a role of microRNA-21 in the resolution of wound inflammation. *J Immunol* 2014; 192: 1120-1129. doi: 10.4049/jimmunol.1300613

Mor F, Quintana FJ, Cohen IR. Angiogenesis-inflammation cross-talk: vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization. *J Immunol* 2004; 172: 4618-4623.

Sivak JM, Ostriker AC, Woolfenden A, Demirs J, Cepeda R, Long D, Anderson K, Jaffee B. Pharmacologic uncoupling of angiogenesis and inflammation during

initiation of pathological corneal neovascularization. *J Biol Chem* 2011; 286: 44965-44975. doi: 10.1074/jbc.M111.294967

Jiang FS, Tian SS, Lu JJ, Ding XH, Qian CD, Ding B, Ding ZS, Jin B. Cardamonin Regulates miR-21 Expression and Suppresses Angiogenesis Induced by Vascular Endothelial Growth Factor. *Biomed Res Int* 2015: 501581. doi: 10.1155/2015/501581

Liu Y, Luo F, Wang B, Li H, Xu Y, Liu X, Shi L, Lu X, Xu W, Lu L, Qin Y, Xiang Q, Liu Q. STAT3-regulated exosomal miR-21 promotes angiogenesis and is involved in neoplastic processes of transformed human bronchial epithelial cells. *Cancer Lett* 2016; 370: 125-135. doi: 10.1016/j.canlet.2015.10.011

Abid MR, Schoots IG, Spokes KC, Wu SQ, Mawhinney C, Aird WC. Vascular endothelial growth factor-mediated induction of manganese superoxide dismutase occurs through redox- dependent regulation of forkhead and IkappaB/NF-kappaB. *J Biol Chem* 2004; 279: 44030–44038.

Reside J, Everett E, Padilla R, Arce R, Miguez P, Brodala N, De Kok I, Nares S. In vivo assessment of bone healing following Piezotome® ultrasonic instrumentation. *Clin Implant Dent Relat Res* 2015; 17: 384–394. <https://doi.org/10.1111/cid.12094>

Zhang X, Ng W-L, Wang P, Tian LL, Werner E, Wang H, Doetsch P, Wang Y. MicroRNA-21 modulates the levels of reactive oxygen species levels by targeting SOD3 and TNF α . *Cancer Res* 2012; 72: 4707–4713. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0639>

Stoica SC, Dorobantu DM, Vardeu A, Biglino G, Ford KL, Bruno DV, Zakkar M, Mumford A, Angelini GD, Caputo M, Emanuelli C. MicroRNAs as potential biomarkers in congenital heart surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2019; S0022-5223: 30740–30748. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2019.03.062>

Mozzati M, Gallesio G, Ullio L, Staiti G, Lucchina AG, Mortellaro C. Patient-based assessment of tooth extraction with ultrasonic dental surgery. *J Craniofac Surg.* 2014; 25: 2081-2083. doi:10.1097/SCS.0000000000001011

Napoli, N.; Chandran, M.; Pierroz, D.D.; Abrahamsen, B.; Schwartz, A.V.; Ferrari, S.L.; IOF Bone and Diabetes Working Group. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2017; 13: 208–219.

Napoli, N.; Strollo, R.; Paladini, A.; Briganti, S.I.; Pozzilli, P.; Epstein, S. The alliance of mesenchymal stem cells, bone, and diabetes. *Int. J. Endocrinol.* 2014; 2014: 690783.

Hamann, C.; Kirschner, S.; Günther, K.-P.; Hofbauer, L.C. Bone, sweet bone—osteoporotic fractures in diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2012; 8: 297–305.

Hariri AF, Almatrafi MN, Zamka AB, et al. Relationship between Body Mass Index and T-Scores of Bone Mineral Density in the Hip and Spine Regions among Older Adults with Diabetes: A Retrospective Review. *J Obes.* 2019; 2019: 9827403. doi:10.1155/2019/9827403

Hupp J. Principles of More Complex Exodontia. In: Hupp J, Ellis E, Tucker M, editors. *Contemporary Oral and Maxillofacial surgery*, 6th edition. (Chap. 8), St. Louis, Missouri, Mosby Publishing, Elsevier 2014; p. 119-142.

Wang, H.L., Kiyonobu, K., Neiva, R.F. Socket augmentation: rationale and technique. *Implant Dentistry* 2004; 13: 286–296.

Babbush, C.A. A new atraumatic system for tooth removal and immediate implant restoration. *Implant Dentistry* 2007; 16: 139–145.

Spinato S, Rebaudi A, Bernardello F, Bertoldi C, Zaffe D. Piezosurgical treatment of crestal bone: quantitative comparison of post-extractive socket outcomes with those of traditional treatment. *Clin Oral Implants Res.* 2016; 27: 361-366. doi:10.1111/clr.12555

Tsikopoulos A, Tsikopoulos K, Doxani C, et al. Piezoelectric or Conventional Osteotomy in Rhinoplasty? A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Outcomes. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2020; 82: 216-234. doi:10.1159/000506707

Raghavendra, S., Wood, M., Taylor, T.D. Early wound healing around endosseous implants: a review of the literature. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 2005; 20: 425–431.

Simonetti, M., Facco, G., Barberis, F., Signorini, G., Capurro, M., Rebaudi, A., Sammartino, G.. Bone characteristics following osteotomy surgery: an in vitro SEM study comparing traditional Lindemann drill with sonic and ultrasonic instruments. *Poseido Journal* 2013; 1: 187–194.

Fagade OO, Oginni FO. Intra-operative pain perception in tooth extraction--possible causes. *Int Dent J.* 2005; 55: 242-246. doi:10.1111/j.1875-595x.2005.tb00322.x

Benemei S, Nicoletti P, Capone JG, Geppetti P. CGRP receptors in the control of pain and inflammation. *Curr Opin Pharmacol.* 2009; 9: 9-14. doi:10.1016/j.coph.2008.12.007

Roque M, Martinez MJ, Alonso P, Catala E, Garcia JL, Ferrandiz M. Radioisotopes for metastatic bone pain. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003; 4: CD003347. doi:10.1002/14651858.CD003347

Rashad, A., Sadr-Eshkevari, P., Weuster, M., Schmitz, I., Prochnow, N, Maurer, P. Material attrition and bone micromorphology after conventional and ultrasonic implant site preparation. *Clinical Oral Implants Research* 2013; 24: 110–114.

Gao Y, Lin Z, Rodella LF, Buffoli B, Wu X, Zhou Y. Piezoelectric ultrasonic bone surgery system in the extraction surgery of supernumerary teeth. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014; 42: 1577-1582. doi:10.1016/j.jcms.2014.04.007

Morley GK, Mooradian AD, Levine AS, Morley JE. Mechanism of pain in diabetic peripheral neuropathy. Effect of glucose on pain perception in

humans. *Am J Med.* 1984; 77: 79-82. doi:10.1016/0002-9343(84)90439-x

Penarrocha M, Sanchis JM, Saez U, et al: Oral hygiene and postoperative pain after mandibular third molar surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 92: 260.

Merskey H. Diagnosis of the patient with chronic pain. *J Human Stress.* 1978; 4: 3-7. doi:10.1080/0097840X.1978.9934979

Landry RG, Turnbull RS, Howley. Effectiveness of benzydamyne HCl in the treatment of periodontal post-surgical patients. *Res Clin Forums T* 1988; 10: 105–118.

Power DJ, Sambrook PJ, Goss AN. The healing of dental extraction sockets in insulin-dependent diabetic patients: a prospective controlled observational study. *Aust Dent J.* 2019; 64: 111-116. doi:10.1111/adj.12669

Fernandes KS, Glick M, de Souza MS, Kokron CM, Gallottini M. Association between immunologic parameters, glycemic control, and postextraction complications in patients with type 2 diabetes. *J Am Dent Assoc.* 2015; 146: 592-599. doi:10.1016/j.adaj.2015.02.014

Retzepi M, Donos N. The effect of diabetes mellitus on osseous healing. *Clin Oral Implants Res.* 2010; 21: 673-681. doi:10.1111/j.1600-0501.2010.01923.x

Huang S, Dang H, Huynh W, Sambrook PJ, Goss AN. The healing of dental extraction sockets in patients with Type 2 diabetes on oral hypoglycaemics: a prospective cohort. *Aust Dent J.* 2013; 58: 89-93. doi:10.1111/adj.12029

Rosenberg CS. Wound healing in the patient with diabetes mellitus. *Nurs Clin North Am* 1990; 25: 247–261.

Ekmektzoglou KA, Zografos GC. A concomitant review of the effect of diabetes mellitus and hypothyroidism in wound healing. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2721–2729.

Lioupis C. Effects of diabetes mellitus on wound healing: an update. *J Wound Care* 2005; 14: 84–86.

Peleg AY, Weerarathna T, McCarthy JS, Davis TM. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev* 2007; 23: 3–13.

Jacober SJ, Sowers JR. An update on perioperative management of diabetes. *Arch Intern Med* 1999; 159: 2405–2411.

Outtara A, Lecombe P, Le Manach Y, et al. Poor intraoperative blood glucose control is associated with worsened hospital outcome after cardiac surgery in diabetic patients. *Anesthesiology* 2005; 103: 687–694.

Latham R, Lancaster AD, Covington JF, Pirolo JS, Thomas CS. The association of diabetes and glucose control with surgical site infections among cardiothoracic surgery patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; 22: 607–612.

Yamaguchi T. Bone fragility in type 2 diabetes mellitus. *World J Orthop* 2010; 1: 3–9.

Carnevale V, Romagnoli E, D’Erasmus L, D’Erasmus E. Bone damage in type 2 diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014; 24: 1151–1157.

Einhorn TA, Boskey AL, Gundberg CM, Vigorita VJ, Devlin VJ, Beyer MM. The mineral and mechanical properties of bone in chronic experimental diabetes. *J Orthop Res* 1988; 6: 317–323.

Blakytyn R, Spraul M, Jude EB. Review: The diabetic bone: A cellular and molecular perspective. *Int J Low Extrem Wounds* 2011; 10: 16–32.

Coords M, Breitbart E, Paglia D, et al. The effects of low-intensity pulsed ultrasound upon diabetic fracture healing. *J Orthop Res* 2011; 29: 181–188.

Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000; 404: 787–790.

La Sala L, Mrakic-Sposta S, Micheloni S, Prattichizzo F, Ceriello A. Glucose-sensing microRNA-21 disrupts ROS homeostasis and impairs antioxidant responses in cellular glucose variability. *Cardiovasc Diabetol*. 2018; 17:105. doi:10.1186/s12933-018-0748-2

Kato M, Castro NE, Natarajan R. MicroRNAs: potential mediators and biomarkers of diabetic complications. *Free Radical Biol Med*. 2013; 64: 85–94.

Jansen F, Wang H, Przybilla D, Franklin BS, Dolf A, Pfeifer P, Schmitz T, Flender A, Endl E, Nickenig G, et al. Vascular endothelial microparticles incorporated microRNAs are altered in patients with diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2016; 15: 49.

La Sala L, Cattaneo M, De Nigris V, Pujadas G, Testa R, Bonfigli AR, Genovese S, Ceriello A. Oscillating glucose induces microRNA-185 and impairs an efficient antioxidant response in human endothelial cells. *Cardiovasc Diabetol*. 2016; 15: 71.

Krichevsky AM, Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med*. 2009; 13: 39-53. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00556.x

Zarjou A, Yang S, Abraham E, Agarwal A, Liu G. Identification of a microRNA signature in renal fibrosis: role of miR-21. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011; 301: F793-F801. doi:10.1152/ajprenal.00273.2011

Chau BN, Xin C, Hartner J, et al. MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways. *Sci Transl Med*. 2012; 4: 121ra18. doi:10.1126/scitranslmed.3003205

Santana RB, Xu L, Chase HB, Amar S, Graves DT, Trackman PC. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2003; 52: 1502-1510. doi:10.2337/diabetes.52.6.1502

Gandhi A, Doumas C, O'Connor JP, Parsons JR, Lin SS. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone* 2006; 38: 540-546. doi:10.1016/j.bone.2005.10.019

Amin AH, Abd Elmageed ZY, Nair D, et al. Modified multipotent stromal cells with epidermal growth factor restore vasculogenesis and blood flow in ischemic hind-limb of type II diabetic mice. *Lab Invest.* 2010; 90: 985-996. doi:10.1038/labinvest.2010.86

Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, et al. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J Pathol.* 2004; 164: 1935-1947. doi:10.1016/S0002-9440(10)63754-6

Colnot C, Thompson Z, Miclau T, et al. Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development* 2003; 130: 4123-4133.

Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000; 14: 2123-2133.

Stickens D, Behonick DJ, Ortega N, et al. Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development* 2004; 131: 5883-5895.

Behonick DJ, Xing Z, Lieu S, et al. Role of matrix metalloproteinase 13 in both endochondral and intramembranous ossification during skeletal regeneration. *PLoS One* 2007; 2: e1150.

Lieu S, Hansen E, Dedini R, et al. Impaired remodeling phase of fracture repair in the absence of matrix metalloproteinase-2. *Dis Model Mech* 2011; 4: 203-211.

Dan H, Simsa-Maziol S, Hisdai A, et al. Expression of matrix metalloproteinases during impairment and recovery of the avian growth plate. *J Anim Sci* 2009; 87: 3544- 3555.

Ortega N, Wang K, Ferrara N, et al. Complementary interplay between matrix metalloproteinase-9, vascular endothelial growth factor and osteoclast function drives endochondral bone formation. *Dis Model Mech* 2010; 3: 224-235.

Vu TH, Shipley JM, Bergers G, et al. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 1998;

93: 411-422.

Yu YY, Lieu S, Lu C, et al. Bone morphogenetic protein 2 stimulates endochondral ossification by regulating periosteal cell fate during bone repair. *Bone* 2010; 47: 65-73.

Wang Q, Huang C, Xue M, et al. Expression of endogenous BMP-2 in periosteal progenitor cells is essential for bone healing. *Bone* 2011; 48: 524-532.

Bazzichetto C, Conciatori F, Pallocca M, et al. PTEN as a Prognostic/Predictive Biomarker in Cancer: An Unfulfilled Promise?. *Cancers (Basel)*. 2019; 11:435. Published 2019 Mar 28. doi:10.3390/cancers11040435

Xiao Y, Li C, Gu M, et al. Protein Disulfide Isomerase Silence Inhibits Inflammatory Functions of Macrophages by Suppressing Reactive Oxygen Species and NF- κ B Pathway. *Inflammation*. 2018; 41: 614-625. doi:10.1007/s10753-017-0717-z

Fu C, Wei Z, Zhang D. PTEN Inhibits Inflammatory Bone Loss in Ligature-Induced Periodontitis via IL1 and TNF- α . *Biomed Res Int*. 2019; 2019: 6712591. doi:10.1155/2019/6712591

Wang J, Gao Y, Ma M, et al. Effect of miR-21 on renal fibrosis by regulating MMP-9 and TIMP1 in kk-ay diabetic nephropathy mice. *Cell Biochem Biophys*. 2013; 67: 537-546. doi:10.1007/s12013-013-9539-2

Kang KH, Lemke G, Kim JW. The PI3K-PTEN tug-of-war, oxidative stress and retinal degeneration. *Trends in Molecular Medicine*. 2009; 15: 191–198.

Song P, Wu Y, Xu J, Xie Z, Dong Y, Zhang M, Zou MH. Reactive nitrogen species induced by hyperglycemia suppresses Akt signaling and triggers apoptosis by upregulating phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) in an LKB1-dependent manner. *Circulation*. 2007; 116: 1585–1595.

Mocanu MM, Field DC, Yellon DM. A potential role for PTEN in the diabetic heart. *Cardiovascular drugs and therapy/sponsored by the International Society of*

Cardiovascular Pharmacotherapy. 2006; 20: 319–321.

Wang B, Raedschelders K, Shrivah J, et al. Differences in myocardial PTEN expression and Akt signalling in type 2 diabetic and nondiabetic patients undergoing coronary bypass surgery. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011; 74: 705-713. doi:10.1111/j.1365-2265.2011.03979.x

Dey N, Das F, Mariappan MM, Mandal CC, Ghosh–Choudhury N, Kasinath BS, Choudhury GG. MicroRNA–21 orchestrates high glucose–induced signals to TOR complex 1, resulting in renal cell pathology in diabetes. *J Biol Chem*. 2011; 286: 25586–25603.

Luo M, Tan X, Mu L, et al. MiRNA-21 mediates the antiangiogenic activity of metformin through targeting PTEN and SMAD7 expression and PI3K/AKT pathway. *Sci Rep*. 2017; 7: 43427. doi:10.1038/srep43427

Krentz AJ, Bailey CJ. Oral antidiabetic agents: Current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 2005; 65: 385–411.

Mai QG, Zhang ZM, Xu S, et al. Metformin stimulates osteoprotegerin and reduces RANKL expression in osteoblasts and ovariectomized rats. *J Cell Biochem* 2011; 112: 2902–2909.

Meier C, Schwartz AV, Egger A, Lecka-Czernik B. Effects of diabetes drugs on the skeleton. *Bone* 2015; 82: 93–100.

Serrão CR, Bastos MF, Cruz DF, de Souza Malta F, Vallim PC, Duarte PM. Role of Metformin in Reversing the Negative Impact of Hyperglycemia on Bone Healing Around Implants Inserted in Type 2 Diabetic Rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2017; 32: 547-554. doi:10.11607/jomi.5754

Shao X, Cao X, Song G, Zhao Y, Shi B. Metformin rescues the MG63 osteoblasts against the effect of high glucose on proliferation. *J Diabetes Res* 2014; 2014: 453940.

Liu L, Zhang C, Hu Y, Peng B. Protective effect of metformin on periapical lesions in rats by decreasing the ratio of receptor activator of nuclear factor kappa

B ligand/osteoprotegerin. *J Endod* 2012; 38: 943–947.

Jang WG, Kim EJ, Bae IH et al. Metformin induces osteoblast differentiation via orphan nuclear receptor SHP-mediated transactivation of Runx2. *Bone* 2011; 48: 885–893.

Chen SC, Brooks R, Houskeeper J et al. Metformin suppresses adipogenesis through both AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent and AMPK-independent mechanisms. *Mol Cell Endocrinol* 2017; 440: 57–68.

Yu JW, Deng YP, Han X, Ren GF, Cai J, Jiang GJ. Metformin improves the angiogenic functions of endothelial progenitor cells via activating AMPK/eNOS pathway in diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol* 2016; 15:88.

BIOGRAFIJA

Milan V. Vučetić

Milan V. Vučetić, rođen je Kotoru (Crna Gora), 20.05.1987. Osnovnu školu i gimnaziju je završio u Kotoru, sa odličnim uspehom i kao nosilac Luča diplome. Na Stomatološki fakultet, Univerziteta u Beogradu se upisao školske 2006/07. godine. Diplomirao je januara 2012. godine s prosečnom ocenom 9.39. Pripravnički staž je obavio na Stomatološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu 2012/13. godine i položio stručni ispit. Doktorske studije je upisao 2013. godine na predmetu Oralna hirurgija, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Od 2013. godine zaposlen je na Stomatološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, kao naučni saradnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. 175021, pod nazivom “Kontrola bola i molekularni mehanizmi u regenerativnoj terapiji u stomatologiji kod zdravih i pacijenata sa dijabetes melitusom”. Bavi se naučnoistraživačkim radom iz oblasti oralne hirurgije, piježohirurgije, oralne implantologije i koštane regeneracije. Aktivan je član Internacionalne organizacije za implantologiju (eng. *International Team for Implantology-ITI*) od 2014. godine i Evropskog udruženja za oseointegraciju (eng. *European Association for Osseointegration-EAO*) od 2016. godine. Učestvovao je na brojnim kongresima i kursevima iz oblasti oralne hirurgije, implantologije i parodontalne hirurgije (Beograd-Srbija; Bern-Švajcarska; Rim-Italija; Ženeva-Švajcarska; London-Engleska; Bazel-Švajcarska; Padova-Italija; Pariz-Francuska; Madrid-Španija; Pretorija-Južnoafrička Republika; Farmington, CT-SAD; Parsippany, NJ-SAD; Santa Monika, CA-SAD; Boston, MA, SAD; Fairfield, CT-SAD; Uncasville, CT-SAD; Beč-Austrija). Bio je stipendista ITI organizacije 2017/2018. godine na Klinici za Oralnu i Maksilofacijalnu hirurgiju, Univerziteta u Konektikatu, Sjedinjene Američke Države pod mentorstvom prof. Dr Davida Shafera. Odradio specijalistički staž na Klinici za Oralnu hirurgiju, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu 2017/2020. godine. Govori engleski jezik.

Bibliografija

Publikovani radovi:

1. **Vucetic M**, Roganovic J, Freilich M, Shafer D, Milic M, DJukic L, Petrovic N, Markovic E, Markovic A, Brkovic B. Bone microRNA-21 as surgical stress parameter is associated with third molar postoperative discomfort [published online ahead of print, 2020 Jun 4]. *Clin Oral Investig.* 2020;10.1007/s00784-020-03366-6. doi:10.1007/s00784-020-03366-6
2. Brković B, Andrić M, Čalasan D, Milić M, Stepić J, **Vučetić M**, Brajković D, Todorović L. Efficacy and safety of 1% ropivacaine for postoperative analgesia after lower third molar surgery: a prospective, randomized, double-blinded clinical study. *Clin Oral Investig.* 2017; 21: 779-785. doi:10.1007/s00784-016-1831-2
3. Biočanin V, Milić M, **Vučetić M**, Vasović M, Živadinović D, Živadinović M, Četković D, Čalasan D, Brković B. Apical root-end filling with tricalcium silicate-based cement in a patient with diabetes mellitus: A case report. *Vojnosanit Pregl.* 2016; 73: 1173-1177. doi:10.2298/VSP150606137B
4. Brajković D, Biočanin V, Milić M, **Vučetić M**, Petrović R, Brković B. Quality of analgesia after lower third molar surgery: A randomised, double-blind study of levobupivacaine, bupivacaine and lidocaine with epinephrine. *Vojnosanit Pregl.* 2015; 72: 50-56. doi:10.2298/vsp1501050b

Saopštenja sa međunarodnih skupova:

1. Madunic J, Shum L, **Vucetic M**, Novak S, Kalajzic I (2020). PDGF Regulation of BMP2-Mediated Osteogenesis. Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, September 11-15, 2020. Virtual Event. Presentation Number: P-697.
2. Roganović, J., **Vucetic, M.**, Petrović, N., Besu, I., Brkovic, B. (2019). Expression of microRNA-21 and PTEN Protein in the Alveolar Bone of Type 2 Diabetic Patients. 2019 CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress (Madrid, Spain, 19-21 September 2019); Continental European and Scandinavian Divisions Meeting (Poster Session: Mineralized Tissues and Ameloblast Function. Final Presentation ID: 0150, Thursday, 09/19/2019 <https://iadr.abstractarchives.com/abstract/ced-iadr2019-3220837/expression-of-microrna-21-and-pten-protein-in-the-alveolar-bone-of-type-2-diabetic-patients>.
3. Milic, M.S., Todorovic, V.S., Vasovic, M., **Vucetic, M.** and Kokovic, V. (2019). Peri-implant bone and soft tissue stability after immediate implant loading in the posterior maxilla. Clin Oral Impl Res, Volume 30, Issue S19: 284-284. Special Issue: 28th Annual Scientific Meeting of the European Association for Osseointegration, 26-28 September 2019. doi:10.1111/clr.240_13509. 15764 Poster Display Clinical Research – Peri-implant Biology.
4. Brkovic, B., Jurisic, T., Milutinovic, S., Milic, M., **Vucetic, M.**, Danilovic, V., Roganovic, J., Djukic, L. and Jurisic, M. (2019). Histomorphometric analysis and VEGF expression after alveolar ridge preservation with beta-TCP collagen in the maxillary esthetic zone. Clin Oral Impl Res, Volume 30, Issue S19: 406-406. Special Issue: 28th Annual Scientific Meeting of the European Association for Osseointegration, 26-28 September 2019. doi:10.1111/clr.362_13509. 15599 Poster Display Clinical Research – Surgery.
5. **Vucetic, M.**, Brkovic, B., Sood, A., Loewenstein, A., Freilich, M. and Shafer, D. (2018). Multidisciplinary approach for functional and esthetic implant supported

reconstruction following mandibular resection– a case presentation. *Clin Oral Impl Res*, Volume 29, Issue S17: 372-372. Special Issue: 27th Annual Scientific Meeting of the European Association for Osseointegration, 11–13 October 2018. doi:10.1111/clr.257_13358. 11522 E-POSTER CLINICAL RESEARCH – SURGERY.

6. **Vucetic, M.**, Freilich, M., Marija, M.S., Djukic, L., Roganovic, J. and Brkovic, B. (2018). The effect of piezosurgery on the oxidative stress and immediate post extraction discomfort following complex teeth extractions prior to implant placement. *Clin Oral Impl Res*, Volume 29, Issue S17: 467-467. Special Issue: 27th Annual Scientific Meeting of the European Association for Osseointegration, 11–13 October 2018. doi:10.1111/clr.352_13358. 12644 E-POSTER CLINICAL RESEARCH – SURGERY.
7. **Vučetić M**, Okada S, Freilich M, Tadinada A. Are Dental Implants Successful in Patients with Compromised Bone Health (Osteopenia/Osteoporosis): A CBCT scan follow-up study. Connecticut State Dental Association - CSDA's 153rd Charter Oak Dental Meeting, May 09, 2018 - May 11, 2018, United States – Uncasville.
8. **Vucetic Milan**, Milic Marija S., Todorovic Vladimir S., Brkovic Bozidar M. (2017). Postoperative discomfort after piezo vs conventional approach in bone grafting procedures. *Clin Oral Impl Res*, Volume 28, Issue S14: 490-490. Special Issue: 26th Annual Scientific Meeting of the European Association for Osseointegration, 5–7 October 2017. doi:10.1111/clr.487_13042. SU-070 E-Poster in Implant Therapy Outcomes, Surgical Aspects.
9. **Vucetic Milan**, Milic Marija S, Brkovic Bozidar M. (2017). Outcome of single implant restoration following ridge preservation with β - TCP/collagen cone in diabetic patients: a report of three cases. *Clin Oral Impl Res*, Volume 28, Issue S14: 518-518. Special Issue: 26th Annual Scientific Meeting of the European Association for Osseointegration, 5–7 October 2017. doi:10.1111/clr.515_13042. SU-096 E-Poster in Implant Therapy Outcomes, Surgical Aspects

10. B. Brković, T. Jurišić, M. Jurišić, **M. Vučetić**, M. Milić, Lj. Tihacek Šojić (2016). Influence of β -TCP/collagen on bone healing in the maxillary aesthetic zone: clinical outcomes and histomorphometric analysis. Clin. Oral Impl. Res., Volume 27, Issue S13: 240-240. Special Issue: Abstracts of the EAO Congress, Paris, France, 29 September – 1 October 2016. doi:10.1111/clr.238_12958. PSA-342 Implant Therapy Outcomes, Surgical Aspects
11. **M. Vučetić**, M. Milić, M. Baćević, J. Stepić, D. Vasovic, Lj. Đukić, J. Roganovic, B. Brković (2016). The influence of a piezoelectric surgery on oxidative stress and postoperative status after autogenous bone grafting procedure. Clin. Oral Impl. Res., Volume 27, Issue S13: 285-285. Special Issue: Abstracts of the EAO Congress, Paris, France, 29 September – 1 October 2016. doi:10.1111/clr.283_12958. PSA-387 Implant Therapy Outcomes
12. B. Brkovic, T. Jurisic, **M. Vucetic**, Lj. Tihacek-Sojic, M. Jurisic. Clinical and histomorphometric outcomes after alveolar ridge preservation with β -TCP/collagen in the maxillary esthetic zone: an interim report. EAO Congress, Stockholm, 24–26 September 2015. Clin. Oral Impl. Res. Volume 26, Issue S12, Pages 60-60. Special Issue: Abstracts of the EAO Congress, Stockholm, 24–26 September 2015. Poster Presentation: 157. doi:10.1111/clr.57_12678
13. Milic M, Todorovic V, **Vučetić M**, Baćević M, Brkovic B. Principals of oral surgical treatment in patients with factor V Leiden: report of 2 cases. 19th CONGRESS OF THE BALKAN STOMATOLOGICAL SOCIETY - BaSS April 24 - 27, 2014, Serbia, Belgrade, Sava Centar. Poster Presentation PP196, str. 190
14. Brajkovic D, Biočanin V, Milic M, **Vučetić M**, Brkovic B. Levobupivacaine, bupivacaine and lidocaine with epinephrine: quality of analgesia after lower third molar surgery. 19th CONGRESS OF THE BALKAN STOMATOLOGICAL SOCIETY - BaSS April 24 - 27, 2014, Serbia, Belgrade, Sava Centar. Oral Presentation OP61, str. 53

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini u zborniku radova sa konferencije (kategorija M33 prema Pravilniku o postupku, načinu vrednovanja i kvantitativnom iskazivanju naučnoistraživačkih rezultata istraživača):

Title: Group 5 ITI Consensus Report: Digital technologies

Author(s): Wismeijer, D., Joda, T., Flügge, T., Fokas, G., Tahmaseb, A., Bechelli, D., Bohner, L., Bornstein, M., Burgoyne, A., Caram, S., Carmichael, R., Chen, C.-Y., Coucke, W., Derksen, W., Donos, N., El Kholy, K., Evans, C., Fehmer, V., Fickl, S., Fragola, G., Gimenez Gonzales, B., Gholami, H., Hashim, D., Hui, Y., Kökat, A., Vazouras, K., Köhl, S., Lanis, A., Leesungbok, R., van der Meer, J., Liu, Z., Sato, T., De Souza, A., Scarfe, W.C., Tosta, M., van Zyl, P., Vach, K., Vaughn, V., **Vucetic, M.**, Wang, P., Wen, B., Wu, V.

Source: CLINICAL ORAL IMPLANTS RESEARCH Volume: 29 Special Issue: SI (Special Issue: Proceedings of the Sixth ITI Consensus Conference. This Consensus Meeting was supported by the International Team for Implantology) Pages: 436-442. DOI: 10.1111/clr.13309 Supplement: 16 Published: OCT 2018 Accession Number: WOS:000449074000027; PubMed ID: 30328201



Bone microRNA-21 as surgical stress parameter is associated with third molar postoperative discomfort

Milan Vucetic¹ · Jelena Roganovic² · Martin Freilich³ · David Shafer⁴ · Marija Milic¹ · Ljiljana DJukic² · Nina Petrovic^{5,6} · Evgenija Markovic⁷ · Aleksa Markovic¹ · Bozidar Brkovic¹ 

Received: 1 February 2020 / Accepted: 20 May 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Objective To evaluate an association between bone levels of inflammation/oxidative stress mediators and postoperative discomfort after third molar conventional or piezosurgery.

Material and methods Twenty-six subjects with bilaterally impacted mandibular third molars, who underwent either piezo or conventional surgery, were included in a split-mouth design study. MicroRNA-21 (miR-21) expression, interleukin-1 beta (IL-1 β), and vascular endothelial growth factor (VEGF) proteins, as well as superoxide dismutase (SOD) activity in alveolar bone, were evaluated. Pain intensity, the first pain appearance, analgesic first use and total dose taken, trismus, and swelling were clinically recorded.

Results MiR-21 expression was higher while VEGF protein was lower in piezosurgery vs. conventional groups. The differences in IL-1 β protein and SOD activity were not significant between groups. The pain intensity on the first day was significantly decreased in piezosurgery group. The first pain appearance and the first analgesic taken were reported sooner in conventional vs. piezosurgical group. Significantly pronounced trismus on the third day following conventional surgery was found. In conventional group, significantly increased trismus was observed on the third compared to the first postoperative day. MiR-21 showed significant correlation with the first pain appearance.

Conclusion Delayed onset of less pronounced postoperative pain after piezosurgical vs. conventional extraction of impacted lower third molar was significantly associated with expression of bone miR-21.

Clinical relevance Alveolar bone miR-21 may reflect surgical stress and is associated with third molar postoperative pain onset.

Keywords miR-21 · VEGF · SOD · IL-1 β · Piezo · Lower third molar

✉ Bozidar Brkovic
brkovic73@yahoo.com

¹ Department of Oral Surgery, School of Dental Medicine, University of Belgrade, Dr Subotica 4, Belgrade 11000, Serbia

² Department of Pharmacology in Dentistry, School of Dental Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

³ Department of Reconstructive Sciences, School of Dental Medicine, University of Connecticut, Farmington, CT, USA

⁴ Department of Craniofacial Sciences, Division of Oral & Maxillofacial Surgery, School of Dental Medicine, University of Connecticut, Farmington, CT, USA

⁵ Department of Radiobiology and Molecular Genetics, Institute of Nuclear Sciences Vinca, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

⁶ Institute for Oncology and Radiology of Serbia, Belgrade, Serbia

⁷ Department of Orthodontics, School of Dental Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Introduction

Postoperative pain, trismus, and swelling reflect inflammatory events following removal of impacted mandibular third molar and are mostly related to surgical injury [1]. The occurrence of postoperative discomfort is more pronounced in the case of total bony impaction and associated with bone properties, as well as with degree and mode of bone removal [2–4]. Piezosurgical mode of bone cutting is a minimally invasive surgical approach that may reduce osteotomy-associated injury to alveolar bone and surrounding soft tissue, and helps overcome limitations of conventional third molar surgical treatment [5, 6]. Furthermore, histological and histomorphometric evidence in animal models demonstrated increased bone formation, as well as lower number of inflammatory cells in sites treated by piezoelectric devices compared with sites where conventional bone-cutting was used [7, 8]. In

line with this, it has been documented that the occurrence of postoperative short-term outcomes such as pain, trismus, and edema has been significantly reduced following third molar piezosurgery [9]; however, underlying mechanisms are not fully understood.

Noteworthy, mentioned surgical techniques differently affect expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), involved in angiogenesis, and receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL), critical mediator of osteoclastogenesis and bone metabolism, reflecting different cellular response to the biomechanical stress induced by the different osteotomy techniques [10]. Biomechanical surgical stress initiates inflammatory reaction [11] associated with oxidative stress [12] and this oxidative stress/inflammation cross-talk is acknowledged by an alteration in production of IL-1 β and regulatory cytokines [13]. Noteworthy, these inflammatory mediators are stress-sensitive, circulate, and could be evaluated within first hour post-acute stress [14].

Recently, microRNAs were pointed as key players in immediate cellular stress responses and might act as promising stress-associated biomarkers [15]. MicroRNAs (miRs) are non-coding RNAs that negatively regulate target gene expression and orchestrate a number of cellular processes including cellular response to injury [16, 17]. One of the most studied miRs is miR-21, ubiquitously and immediately expressed stress-responsive miR, associated with protection of cells exposed to heat, hypoxia, trauma, and oxidative stress [18–21]. Mechanisms underlying its protective effects include anti-inflammatory effect, expressed by regulation of signaling pathways such as nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells (NF- κ B) pathway [22], as well as suppression of oxidative stress by targeting gene of superoxide dismutase (SOD), major antioxidant enzyme, resulting in regulation of cellular ROS levels [18, 20]. It has been shown that inflammation-modulatory miRs, such as miR-21 or miR-155, show altered expression within first hour following stress and could sustain up to 24 h and regulate stress-induced inflammation [23, 24]. Besides being mechanosensitive, miR-21 was found to be a critical posttranscriptional regulator in the alveolar bone-remodeling process under both, normal and inflammatory microenvironments [25]. We aimed to investigate involvement of inflammation/oxidative stress parameters: miR-21, VEGF, IL-1 β or SOD in surgical stress, as well as association of these parameters with postoperative discomfort after conventional or piezosurgical removal of third molar.

Patients and methods

Ethics review

A prospective, randomized, split-mouth, crossover, single blind protocol design was performed according to the ethical

principles of Declaration of Helsinki, and approved by the institutional Ethics Committee (approval no. 36/9). The study was registered with [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) (NCT02942108; <https://clinicaltrials.gov/show/NCT02942108>), prior to participant's enrolment.

Criteria for eligibility, randomization and study design

Selection of patients, randomization of surgical sites, operations and evaluation of postoperative discomfort parameters were performed at the Department of Oral Surgery, School of Dentistry, University of Belgrade, from December 2016 to August 2017.

The study inclusion criteria were signed informed consent, healthy subjects (ASA 1) between 18 and 35 years of age with bilateral, and vertically angulated impacted lower third molars in class C and in position 1 and 2 (Pell and Gregory evaluation) indicated for extractions. Surgical difficulty was standardized in order to increase the probability of similar surgical trauma. Regarding that, all total bony impacted third molars included in the study required crown and root sectioning concerning root number and its morphology. The indication for such approach was made during preoperative panoramic X-ray evaluation and, in case of any concern regarding third molar root morphology, additional cone beam computed tomography analysis was performed. Exclusion criteria were acute infection, dental treatment 24 h before study procedure, poor oral hygiene evaluated with the simplified oral hygiene index [26], recent anti-inflammatory treatment, heavy cigarette smokers (> 10 cigarettes daily), and patients who did not follow-up the study protocol.

All 26 patients were treated with conventional surgical approach and piezosurgery in a split-mouth manner. Surgical sites were randomized according to the surgical technique into groups A and B, using a computer-generated randomization list.

Surgical procedures

All participants were scheduled for surgical intervention in two clinical sessions at least 4 weeks apart. Amoxicillin with clavulanic acid 625 mg oral tablets (Amoksiklav®, Lek farmacevtska družba, Ljubljana, Slovenia) as a prophylactic dose was administered 1 h before procedure. The patients were instructed to rinse the mouth by 0.2% chlorhexidine mouthwash (Curasept® ADS 220 Curaden Health-Care s.r.l., Saronno, Italy), for 1 min before the intervention. Surgical extraction was performed under local anesthesia, using 2% lidocaine hydrochloride with 1:80,000 epinephrine (Lidokain 2% - Adrenalin®, Galenika, Belgrade, Serbia). The same surgeon and assistant did the surgeries. In the group A, a mucoperiosteal flap elevation was performed with a periosteal

elevator (Molt's No.9), and osteotomy, for the tooth crown and root sectioning access, was carried out with a round bur (Meisinger HM 141F023; Meisinger, Neuss, Germany) mounted on a surgical high-speed straight handpiece at a speed of 35,000 rpm. During the drilling, copious irrigation with sterile saline solution was used. On the opposite side of the jaw (group B), the Piezotome Solo LED Device (Satelec, Paris, France) was used in accordance with the manufacturer's instructions, for mucoperiosteal flap elevation (sinus lift 5 tip) and osteotomy (BS1, BS2L, and BS2R) [27]. The frequency of vibration was set up between 28 and 36 kHz and the surgical tip was moved with micro vibration amplitude between 30 and 60 $\mu\text{m/s}$. During the cutting procedure, the surgical tip was cooled with sterile saline solution. Tooth crown and root sectioning in both groups were performed using a high-speed surgical handpiece with a tungsten carbide fissure bur, avoiding contact with the adjacent bone tissue. After completion of extraction, osteotomy for taking bone samples was performed utilizing conventional (round bur) or piezoelectric surgery (piezo tips-BS1, BS2L, and BS2R) technique. At each site, bone samples of approximately $3 \times 5 \times 2$ mm dimensions were taken buccally from the osteotomy access line, which were in a direct contact with surgical sites, where piezo or rotary instruments were cutting bone previously to form an access for tooth crown and root sectioning. The harvested bone specimens were cortical type, due to dimensions of bone samples, especially the dimension of the specimen's depth of 2 mm, which is in correspondance with usual cortical thickness at the region of lower third molars [28]. Bone samples were taken approximately 30 min after the beginning of surgical procedures, and stored at -80 °C until laboratory analyses were done [29, 30]. The dimension of bone samples corresponded to the weight of material necessary for laboratory analysis. All participants received the same postoperative instructions following extraction on both sides of the mandible. In the post-operative period, patients were prescribe amoxicillin with clavulanic acid 625 mg oral tablets (Amoksiklav®, Lek farmacevtska družba, Ljubljana, Slovenia), three times a day, for 3 days. Ibuprofen 400 mg tablets (Brufen®, Galenika, Belgrade, Serbia) was recommended for pain control [27]. Corticosteroids were not administered.

The duration of total intervention was considered as a period between onset of incision and the last suture. The duration of intervention, as well as osteotomy, was recorded for each surgical site.

MiR-21 expression measurements

Bone samples were homogenized in liquid nitrogen, and RNA was extracted with mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion, by Life Technologies), and dissolved in diethylpyrocarbonate distilled, deionized water (DEPC-DW).

Quantity and quality of RNA were analyzed on BioSpec Nano (Shimadzu Corporation, Japan). Samples with A260/A280 ratio of between 1.8 and 2.1 were analyzed.

We transcribed 10 ng of total RNA, with stem-loop reverse transcription primers for miR-21 (ID:000397) and small nuclear RNA RNU6B (ID:001093), (TaqMan, Applied Biosystems, Foster City, California, USA), incubated for 30 min at 16 °C, 30 min at 42 °C, and 5 min at 85 °C. All reactions were run on Real Time PCR 7500 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), with TaqMan miR-21 assays and RNU6B, served as endogenous control by following thermal conditions: 95 °C for 10 min, 95 °C for 15 s, 60 °C for 60 s for 40 cycles. Analyzed miR-21 was calculated in relative quantity (RQ) values. RQ values were analyzed with the 7500 System SDS Software, Applied Biosystems, Foster City, California, USA, by comparative ddCt method, and RNU6B as endogenous control.

VEGF and IL-1 β protein and SOD activity levels measurements

Bone samples were washed thoroughly with cold PBS/heparin to avoid blood contamination demineralized in 1.2 M HCL, and proteins were extracted by 4 M guanidine HCl /50 mM EDTA in 50 ml Tris pH 7.4, with protease inhibitors and precipitated with acetone. The concentrations of VEGF and IL-1 β in the samples were measured with commercial ELISA kits (Human VEGF Elisa kit, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA and Human Interleukin 1 Beta ELISA kit, Uscn Life Science, Inc. China) while SOD activity (%) was measured spectrophotometrically, using the SOD Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) according to the manufacturer's instructions.

Clinical outcomes

Postoperative outcomes such as pain, trismus, and swelling were evaluated on the first and third postoperative day by the impartial investigator who was not familiar with the type of the surgery applied on the side where measurements were performed.

The intensity of pain was assessed using visual analog scale (VAS) of 10 points in conjunction with graphic rating scale. Patients were advised to record the beginning of pain, first analgesic tablet intake, and the total analgesic dose during 72 h postoperatively [31].

Trismus was recorded by measuring interincisal distance at maximum mouth opening expressed in millimeters. The difference between postoperative measurements and the preoperative baseline values at each follow-up appointment demonstrated the trismus for that day.

Swelling was determined as a difference between the preoperative and postoperative tape measurements between five

facial reference points as previously described [32]. The difference between each postoperative and preoperative values presented swelling for that day.

Intraoperative damage to surrounding structures and postoperative surgical complications were recorded in each individual case.

Statistical analysis

Data analysis was performed with GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, US). The evaluation of data's distribution was tested with D'Agostino-Pearson normality test. Data were presented as mean value \pm standard deviation (SD) and were analyzed with chi-square, Student's paired *t* test, or Wilcoxon signed-rank test, and for multiple comparisons, repeated measures two-way ANOVA was used. Minimal level of significance was set up at 0.05. The power of the study was determined with alpha probability of 0.05 with calculated effect size and power for trismus (effect size 0.79, power 0.9718) and VAS score (effect size 0.91, power 0.9943), using paired *t* test. The Pearson or Spearman correlation tests were used to assess association between clinical parameters with miR-21 or with VEGF expression levels.

Results

Study population flow/characteristics and procedure's duration

The flow diagram demonstrates the design and conduct of the clinical study (Fig. 1). There were no statistically significant differences in demographic characteristics between groups. A total time required for surgical intervention, as well as time needed to perform osteotomy, was significantly shorter in conventional group when compared with piezosurgery group (Table 1).

MiR-21, VEGF, SOD, IL-1 β

The relative expression levels of miR-21 were significantly higher ($p < 0.001$) in bone specimens obtained by piezosurgical device (4.62 ± 0.57) in comparison with samples prepared by conventional bur (3.45 ± 0.99) (Fig. 2a). Differences in miR-21 expression between piezo and conventional group were not affected by gender nor age of participants (Table 2).

The concentration of expressed VEGF protein in collected bone specimens was significantly lower after piezosurgery compared to conventional surgery (23.35 ± 6.94 pg/ml vs. 33.22 ± 8.63 pg/ml, respectively, $p < 0.001$) (Fig. 2b).

The spectrophotometric analysis showed no significant alterations in the activity of SOD between conventional

($43.89\% \pm 23.81\%$) and piezosurgery group ($41.46 \pm 24.07\%$) (Fig. 2c).

No statistically significant difference was found in the IL-1 β protein level in piezosurgery group compared to conventional group (25.50 ± 8.94 pg/ml vs. 20.17 ± 6.16 pg/ml, respectively) (Fig. 2d).

Clinical outcomes

The intensity of pain was significantly lower on the first postoperative day in piezosurgery group in comparison with conventional group. No statistically significant difference was found on the third postoperative day between groups (Table 3).

Postoperative pain and consumption of ibuprofen tablets started sooner in the conventional surgery group compared with piezosurgery group. There was no difference in total analgesic dose between two evaluated groups (Table 3).

Trismus was significantly less noticeable on the third postoperative day in piezosurgery group compared with conventional group. Moreover, group with conventional surgery presented with statistically significant increase in trismus on the third day compared to the measurements on the first day (Table 4).

Swelling was presented in both groups without significant difference. A statistically significant reduction of swelling was noticed on the third day in comparison with the first postoperative day within the groups (Table 4).

All surgical sites healed uneventfully without any complications for all individuals in both groups.

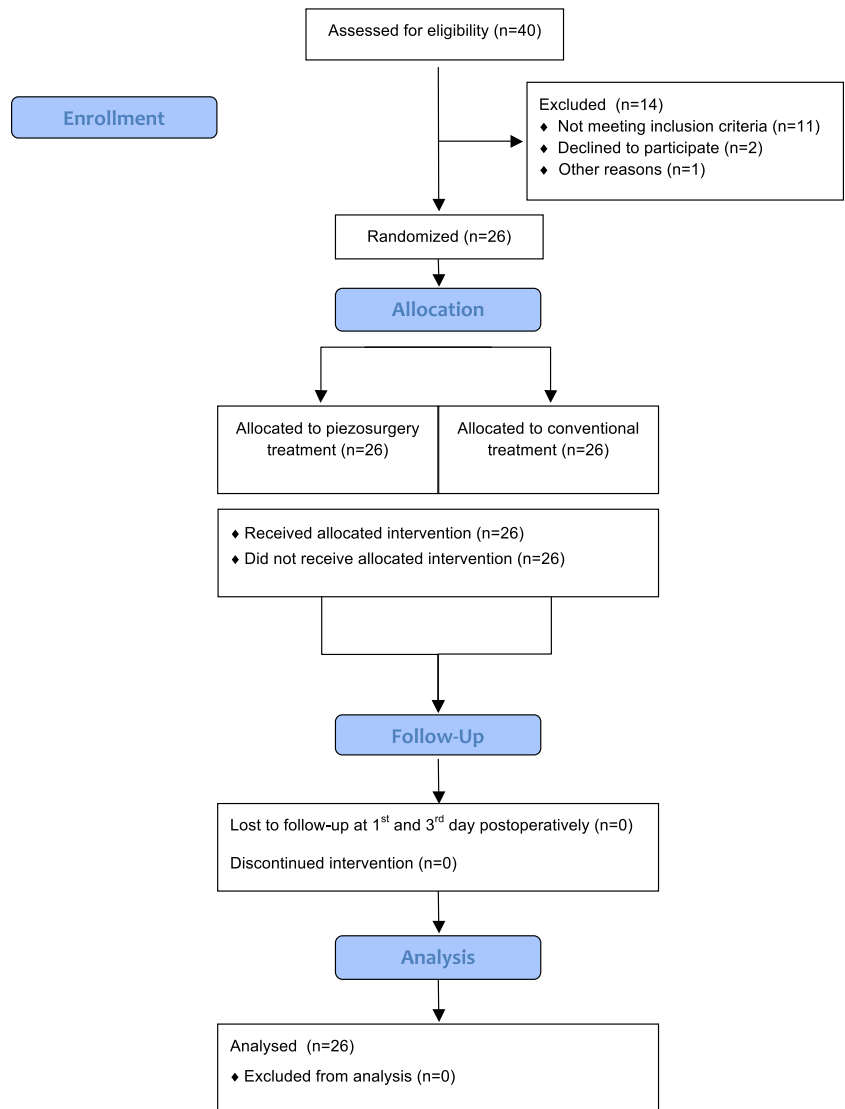
Correlation between miR-21, VEGF and parameters of postoperative pain and trismus

Correlation was tested between molecular and clinical parameters that were significantly different between surgical groups over observation. Significant positive correlation between bone miR-21 expression level and time of first pain appearance was found in both, piezo and conventional groups. Significant negative correlation was found between bone miR-21 expression level and trismus on the third day, as well as VAS score on the first day postoperatively, but only after conventional surgery. We found no significant correlation between VEGF bone levels and parameters of postoperative pain and trismus (Table 5).

Discussion

The findings of this study showed less severe early postoperative clinical outcomes following piezosurgery when compared with conventional approach. Notably, lower pain intensity on the first day following piezosurgery and decreased

Fig. 1 Flow chart of study population allocated to piezosurgery and conventional treatment in split-mouth manner



trismus on the third day were detected. Although, at the molecular level, piezosurgery was followed by an increased expression of inflammation-modulatory miR-21 and decreased

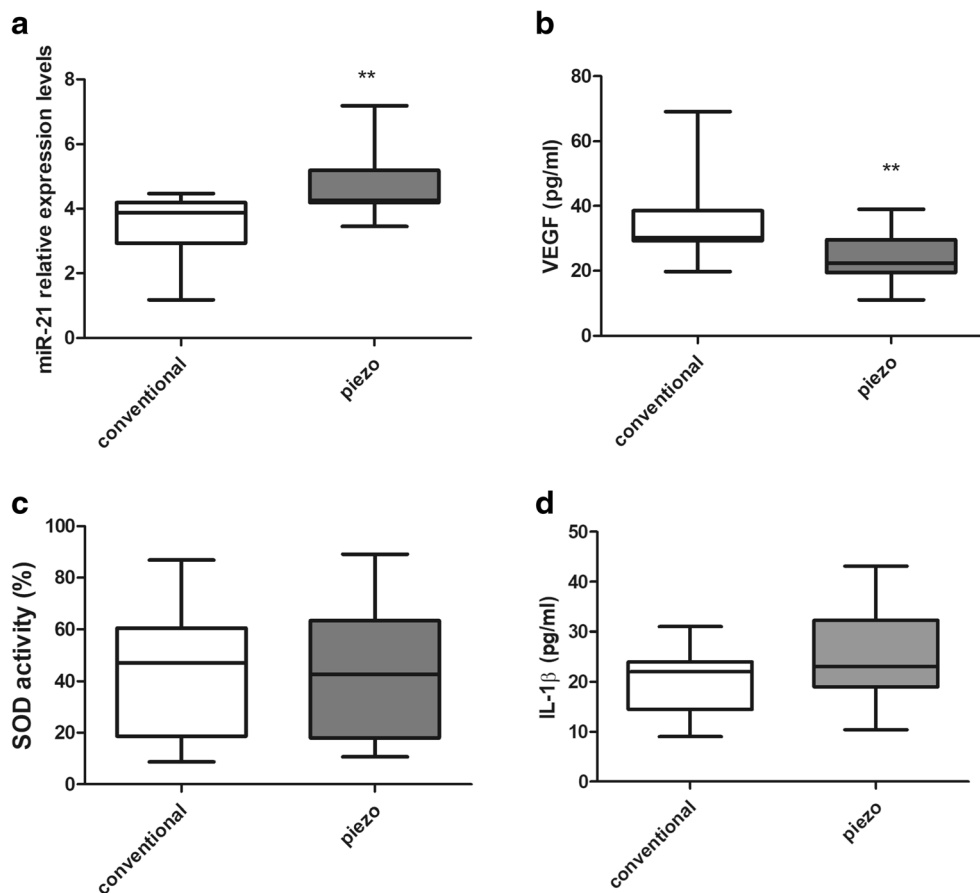
expression of VEGF in alveolar bone, only bone miR-21 was shown to be significantly associated with the delayed onset of postoperative pain.

Table 1 Basic demographic and clinical features

Parameters		Surgery		<i>p</i>
		Piezosurgery (<i>N</i> = 26)	Conventional (<i>N</i> = 26)	
Age, mean ± SD	Male	23.00 ± 2.58	23.00 ± 2.58	
	Female	22.00 ± 3.32	22.00 ± 3.32	
Gender, <i>N</i>	Male	14	14	
	Female	12	12	
Duration of the procedure (min), mean ± SD				
Total intervention		32.55 ± 5.50	29.35 ± 4.56	< 0.05
Osteotomy		4.50 ± 1.01	3.25 ± 0.98	< 0.001

Age, *t* independent test; Gender, χ^2 test; Duration of procedures, Student's *t* test; *N*, number of participants per group

Fig. 2 **a** miR-21-relative expression in alveolar bone after piezosurgery or conventional surgery used in third molar. **b** VEGF protein levels in alveolar bone after piezosurgery or conventional surgery used in third molar extractions. Boxplots. **c** SOD activity in alveolar bone after piezosurgery or conventional surgery used in third molar extractions. Boxplots. **d** IL-1 β levels in alveolar bone after piezosurgery or conventional surgery used in third molar extractions. Boxplots represent IL-1 β protein levels. ****** $p < 0.001$



Postoperative discomforts after surgical lower third molar removal depend on anatomic-related, patient-related, and operation-related factors. However, it has been reported that deeper impactions, bone removal, and a wider flap reflection were associated with a higher risk of trismus and postoperative pain, while in the soft tissue impactions or partial bone impactions, only the risk of trismus was significantly reduced [2, 33]. Therefore, bone samples directly affected by surgery were collected to determine possible

correlation between bone molecular and cellular factors and the level of postoperative morbidity.

Present clinical results showed significantly lower pain intensity and delayed onset of postoperative pain and 1st analgesic consumption in piezosurgery when compared with conventional group. On the other side, pronounced trismus on the third day after third molar extraction with conventional technique along with significant increase in trismus on the 3rd vs. 1st day postoperatively in conventional group was observed.

Table 2 Influence of age and gender differences on miR-21 expression after utilizing piezosurgical and conventional techniques

	miR-21 expression (mean \pm SD)		F ratio	N	p value
	Piezosurgery (N = 26)	Conventional surgery (N = 26)			
Gender			0.14		0.71
Men	4.64 \pm 0.56**	3.51 \pm 0.97		14	
Women	4.58 \pm 0.58**	3.38 \pm 1.04		12	
Age			0.37		0.54
18–22 years old	4.73 \pm 0.54**	3.41 \pm 0.83		12	
23–31 years old	4.42 \pm 0.54**	3.43 \pm 1.11		14	

** $p < 0.01$ conventional vs. piezosurgery

Age, gender, and miR-21 expression, two-way ANOVA (repeated measures)

N, number of participants per group; miR-21, microRNA-21

Table 3 Postoperative parameters related to pain after utilizing piezosurgical and conventional techniques

Parameters	Surgery		<i>p</i>
	Piezosurgery (<i>N</i> = 26)	Conventional (<i>N</i> = 26)	
Pain intensity VAS (mm) mean ± SD	1 day	21.28 ± 9.43	< 0.01
	3 days	23.92 ± 13.73	
Time frames (min), mean ± SD			
First postoperative pain report		175.89 ± 64.70	< 0.05
First analgesic consumption		279.44 ± 155.04	< 0.05
Number of analgetics, mean ± SD (min-max)		1.42 ± 1.42 (0-6)	1.84 ± 1.64 (0-6)

Pain intensity and time frames, Student's *t* test
 Number of analgetics, Wilcoxon signed-rank test
N, number of participants per group; VAS, visual analog scale

These clinical findings imply piezosurgery to be less stressful and accompanied by a decreased inflammatory response following surgical injury, which were in agreement with the results of other clinical studies [27, 34]. The underlying explanation could be less traumatic flap manipulation, with preservation of periosteal microcirculation, following piezosurgically assisted flap elevation [35], which leads to decreased inflammation after piezosurgery. It has been known that the main advantage of piezosurgical approach is, beside its selective and controlled bone cutting, prevention of the soft tissue damage, especially possible during the conventional flap elevation regarding tearing of periosteum and muscle fibers. Moreover, it has been shown that the osteotomy sites where conventional bur was used presented traces of debris and bone fragments, and therefore altered macrophage response, which could cause delayed healing [36]. Accordingly, scanning electron microscopy study of Blaskovic et al. pointed out significant differences in appearance of bone defects immediately after conventional vs. piezosurgery and accelerated first stage of bone healing associated with piezosurgery [37].

Results of the present study showed that bone miR-21 expression levels were lower after conventional compared with piezosurgery and consistent for men and women as well as for

different age, suggesting that level of miR-21 in the bone is associated to the different type and degree of stress and injury caused by surgical technique used. In line with this, miR-21 was shown to be immediate stress-responsive miR [18–21], critically involved in mechanical force-induced alterations in cellular function in vitro [38]. During the surgical procedure, mechanical stress initiates inflammatory reaction mediated principally by macrophages [11]. MiR-21 is the most abundant miR in macrophages and plays a key role in the resolution of inflammatory reaction, initiated by injury [39]. Additionally, miR-21 exerts anti-inflammatory properties by suppressing NF-κB signaling which plays a critical role in regulating of inflammation [40]. Having in mind inflammation-tuning effects of miR-21 following injury, higher miR-21 expression following piezo- compared to conventional surgery in the present study may suggest its contribution to decreased inflammatory effect postoperatively. In order to investigate such premise, we examined the association of bone miR-21 expression with the occurrence of postoperative parameters of pain and trismus and found it to be significantly, positively correlated with the delayed onset of postoperative pain in both, piezo and conventional group. We observed significant association between miR-21 expression

Table 4 Postoperative trismus and swelling on the 1st and 3rd day after utilizing piezosurgical and conventional techniques

Parameters	Surgery		<i>p</i>
	Piezosurgery (<i>N</i> = 26)	Conventional (<i>N</i> = 26)	
Trismus (mm), mean ± SD	1 day	8.98 ± 5.71	< 0.001
	3 days	10.01 ± 4.91	
	<i>p</i>		
Swelling (mm), mean ± SD	1 day	10.00 ± 3.24	< 0.001
	3 days	6.28 ± 2.93	
	<i>p</i>	< 0.001	

Trismus and swelling, Student's *t* test
N, number of participants per group

Table 5 Correlation coefficients between bone miR-21, VEGF, and parameters of postoperative discomfort

Parameters	Trismus (3rd day)		VAS (1st day)		Time to first pain appearance	
	Piezo	Conventional	Piezo	Conventional	Piezo	Conventional
miR-21	- 0.03	- 0.44*	0.20	- 0.65**	0.45*	0.57**
VEGF	- 0.13	- 0.11	0.14	0.05	- 0.14	0.27

** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

Correlation coefficients, Spearman and Pearson correlation's tests

VAS, visual analog scale; *miR-21*, microRNA-21; *VEGF*, vascular endothelial growth factor

levels and 3rd day trismus, as well as 1st day VAS score, but only in conventional groups, where more pronounced pain and trismus were measured. Therefore, it seems that miR-21 may be involved in postsurgical inflammation regulation and it could be a surgical marker of postoperative discomfort onset.

Another bone injury-sensitive mediator, VEGF, presently was found to be greater following the conventional osteotomy compared to piezosurgery, suggesting VEGF could be reflecting degree of surgical stress. In line with this, Nakai T et al. showed that VEGF, released by osteoblasts, increases in response to mechanical stress [41]. Having in mind that osteotomy upregulates the expression of pro-inflammatory cytokines such as IL-1, interleukin 6 (IL-6), and interleukin-8 (IL-8), which increase VEGF expression [42], and critical role of VEGF in inflammatory events after bone trauma [43], present results may imply pronounced inflammatory response following conventional surgery. Presumably VEGF being inflammatory marker, we investigated its relation to clinical parameters, but observed no association with either measured parameter of postoperative discomfort. Regarding other inflammatory markers, expression bone levels of IL-1 β , member of IL-1 family, were measured. Unexpectedly, no difference between protein levels of IL-1 β in piezosurgery compared with conventional osteotomies was found. This may be due to the fact that cellular environment that is associated with different osteotomy techniques [37] may dictate the form of IL-1 release [44] and prevalent IL-1 α instead of IL-1 β release in conventional surgery. However, we did not investigate presently the effect of surgical stress on soft tissue cellular perturbations and it was not possible to take multiple samples of tissues at different postoperative time points in order to follow-up the early inflammatory phase; thus, limitation for understanding osteotomy/inflammation signaling network in whole was noticed.

Various surgical techniques are accompanied by the significant increase in oxidative stress along with inflammatory markers [45]. In addition, accumulation of free radicals is responsible for a substantial inflammatory response associated with cellular injury [12]. We investigated the activity of SOD, as a parameter of free oxygen radical's generation, but found

no difference in SOD activity levels between surgical techniques, which could be due to different modulation of this antioxidant enzyme by VEGF and miR-21. Namely, it has been shown that VEGF induces SOD under conditions of both, inducible and basal levels of ROS [46], while at the same time, miR-21 modulates the levels of ROS by suppressing SOD family genes [47].

In conclusion, application of piezosurgery in extraction of impacted mandibular third molars is clinically beneficial surgical modality related to the reduction of trismus and pain. The expression of inflammation/oxidative stress-modulatory miR-21 in the bone reflects surgical stress and is associated with delayed onset of postoperative pain. This is the first study that investigated potential association of surgery-induced alteration in microRNA, as stress parameter, with third molar postoperative symptoms originated mainly by surgical trauma, while very recent studies showed that microRNAs could serve as early biomarkers for the postoperative course following heart surgery, and therefore guiding personalized postoperative therapy [48, 49].

Funding Information The Ministry of Education, Science and Technological Development of Republic of Serbia supported this study by grant (no. 175021).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval The study was approved by the institutional Ethics Committee at School of Dental Medicine, University of Belgrade, approval no. 36/9.

Patient consent All participants signed informed consent prior to the enrolment in the study.

References

1. Cho H, Lynham AJ, Hsu E (2011) Postoperative interventions to reduce inflammatory complications after third molar surgery: review of the current evidence. *Aust Dent J* 62:412–419. <https://doi.org/10.1111/adj.12526>

2. Baqain ZH, Karaky AA, Sawair F, Khraisat A, Duaibis R, Rajab LD (2008) Frequency estimates and risk factors for postoperative morbidity after third molar removal: a prospective cohort study. *J Oral Maxillofac Surg* 66:2276–2283. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2008.06.047>
3. De Santana-Santos T, de Souza-Santos AA, Martins-Filho PR, da Silva LC, de Oliveira E, Silva ED, Gomes AC (2013) Prediction of postoperative facial swelling, pain and trismus following third molar surgery based on preoperative variables. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 18:e65–e70
4. Malkawi Z, Al-Omiri MK, Khraisat A (2011) Risk indicators of postoperative complications following surgical extraction of lower third molars. *Med Princ Pract* 20:321–325. <https://doi.org/10.1159/000324550>
5. Pavlikova G, Foltan R, Horka M, Hanzelka T, Borunska H, Sedy J (2011) Piezosurgery in oral and maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg* 40:451–457. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2010.11.013>
6. Vercellotti T, De Paoli S, Nevins M (2001) The piezoelectric bony window osteotomy and sinus membrane elevation: introduction of a new technique for simplification of the sinus augmentation procedure. *Int J Periodontics Restorative Dent* 21:561–567
7. Chiriac G, Herten M, Schwarz F, Rothamel D, Becker J (2005) Autogenous bone chips: influence of a new piezoelectric device (Piezosurgery) on chip morphology, cell viability and differentiation. *J Clin Periodontol* 32:994–999
8. Preti G, Martinasso G, Peirone B, Navone R, Manzella C, Muzio G, Russo C, Canuto RA, Schierano G (2007) Cytokines and growth factors involved in the osseointegration of oral titanium implants positioned using piezoelectric bone surgery versus a drill technique: a pilot study in minipigs. *J Periodontol* 78:716–722
9. Al-Moraissi EA, Elmansi YA, Al-Sharaee YA, Alrmali AE, Alkhutari AS (2016) Does the piezoelectric surgical technique produce fewer postoperative sequelae after lower thirdmolar surgery than conventional rotary instruments? A systematic review and meta analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 45:383–391. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2015.10.005>
10. Miron RJ, Gruber R, Hedbom E, Saulacic N, Zhang Y, Sculean A, Bosshardt DD, Buser D (2013) Impact of bone harvesting techniques on cell viability and the release of growth factors of autografts. *Clin Implant Dent Relat Res*. 15:481–489. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2012.00440.x>
11. Reside J, Everett E, Padilla R, Arce R, Míguez P, Brodala N, De Kok I, Nares S (2015) In vivo assessment of bone healing following Piezotome® ultrasonic instrumentation. *Clin Implant Dent Relat Res* 17:384–394. <https://doi.org/10.1111/cid.12094>
12. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB (2014) Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal* 20:1126–1167. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>
13. Lavieri R, Rubartelli A, Carta S (2016) Redox stress unbalances the inflammatory cytokine network: role in autoinflammatory patients and healthy subjects. *J Leukoc Biol*. 99:79–86. <https://doi.org/10.1189/jlb.3MR0415-159R>
14. Marsland AL, Walsh C, Lockwood K, John-Henderson NA (2017) The effects of acute psychological stress on circulating and stimulated inflammatory markers: a systematic review and meta-analysis. *Brain Behav Immun* 64:208–219. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.01.011>
15. Wiegand C, Savelsbergh A, Heusser P (2017) MicroRNAs in psychological stress reactions and their use as stress-associated biomarkers, especially in human saliva. *Biomed Hub* 2:1–15. <https://doi.org/10.1159/000481126>
16. Olejniczak M, Kotowska-Zimmer A, Krzyzosiak W (2018) Stress-induced changes in miRNA biogenesis and functioning. *Cell Mol Life Sci*. 75:177–191. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2591-0>
17. Leung AK, Sharp PA (2010) MicroRNA functions in stress responses. *Mol Cell*. 40:205–215. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.027>
18. Cheng Y, Liu X, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C (2009) MicroRNA-21 protects against the H₂O₂-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4. *J Mol Cell Cardiol*. 47:5–14. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.01.008>
19. Li CL, Xu ZB, Fan XL, Chen HX, Yu QN, Fang SB, Wang SY, Lin YD, Fu QL (2018) MicroRNA-21 mediates the protective effects of mesenchymal stem cells derived from iPSCs to human bronchial epithelial cell injury under hypoxia. *Cell Transplant*. 27:571–583. <https://doi.org/10.1177/0963689718767159>
20. Zhang T, Ni S, Luo Z, Lang Y, Hu J, Lu H (2019) The protective effect of microRNA-21 in neurons after spinal cord injury. *Spinal Cord*. 57:141–149. <https://doi.org/10.1038/s41393-018-0180-1>
21. Permenter MG, McDyre BC, Ippolito DL, Stallings JD (2019) Alterations in tissue microRNA after heat stress in the conscious rat: potential biomarkers of organ-specific injury. *BMC Genomics*. 20:141. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5515-6>
22. Tahamtan A, Teymouri-Rad M, Nakstad B, Salimi V (2018) Anti-inflammatory microRNAs and their potential for inflammatory diseases treatment. *Front Immunol*. 9:1377. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01377>
23. Li P, Wang G, Zhang XL, He GL, Luo X, Yang J, Luo Z, Shen TT, Yang XS (2019) MicroRNA-155 promotes heat stress-induced inflammation via targeting liver X receptor α in microglia. *Front Cell Neurosci* 13:12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00012>
24. Toldo S, Das A, Mezzaroma E, Chau VQ, Marchetti C, Durrant D, Samidurai A, Van Tassel BW, Yin C, Ockaili RA, Vigneshwar N, Mukhopadhyay ND, Kukreja RC, Abbate A, Salloum FN (2014) Induction of microRNA-21 with exogenous hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemic and inflammatory injury in mice. *Circ Cardiovasc Genet* 7:311–320. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000381>
25. Chen N, Sui BD, Hu CH, Cao J, Zheng CX, Hou R, Yang ZK, Zhao P, Chen Q, Yang QJ, Jin Y, Jin F (2016) microRNA-21 contributes to orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 95:1425–1433. <https://doi.org/10.1177/0022034516657043>
26. Greene JC, Vermillion JR (1964) The simplified oral hygiene index. *J Am Dent Assoc* 68:7–13
27. Goyal M, Marya K, Jhamb A, Chawla S, Sonoo PR, Singh V, Aggarwal A (2012) Comparative evaluation of surgical outcome after removal of impacted mandibular third molars using a piezotome or a conventional handpiece: a prospective study. *Br J Oral Maxillofac Surg* 50:556–561. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2011.10.010>
28. Fistarol F, De Stavola L, Fincato A, Bressan E (2019) Mandibular canal position in posterior mandible: anatomical study and surgical considerations in relation to bone harvesting procedures. *Int J Periodontics Restorative Dent* 39:e211–e218. <https://doi.org/10.11607/prd.3984>
29. Gulnazar Y, Huseyin Kosger H, Tutar Y (2013) A comparison of piezosurgery and conventional surgery by heat shock protein 70 expression. *Int J Oral Maxillofac Surg* 42:508–510. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2012.10.027>
30. Kammerer PW, Gabriel M, Al-Nawas B, Scholz T, Kirchmaier CM, Klein MO (2012) Early implant healing: promotion of platelet activation and cytokine release by topographical, chemical and biomimetic titanium surface modifications in vitro. *Clin Oral Implants Res* 23:504–510. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2011.02153.x>
31. Brajkovic D, Brkovic B, Milic M, Biocanin V, Krsljak E, Stojic D (2014) Levobupivacaine vs. bupivacaine for third molar surgery: quality of anaesthesia, postoperative analgesia and local vascular effects. *Clin Oral Invest* 18:1481–1488. <https://doi.org/10.1007/s00784-013-1114-0>

32. Schultze-Mosgau S, Schmelzeisen R, Frolich JC, Schmele H (1995) Use of ibuprofen and methylprednisolone for the prevention of pain and swelling after removal of impacted third molars. *J Oral Maxillofac Surg* 53:2–7
33. Ravikumar KK, Narayanan V, Mathivanan (2018) Prediction of postoperative outcome in mandibular third molar surgery based on preoperative variables: a prospective clinical study. *Int J Soc Rehabil* 3:14–23
34. Barone A, Marconcini S, Giacomelli L, Rispoli L, Calvo JL, Covani U (2010) A randomized clinical evaluation of ultrasound bone surgery versus traditional rotary instruments in lower third molar extraction. *J Oral Maxillofac Surg* 68:330–336. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2009.03.053>
35. Stoetzer M, Felgentrager D, Kampmann A, Schumann P, Rucker M, Gellrich NC, von See C (2014) Effects of a new piezoelectric device on periosteal microcirculation after subperiosteal preparation. *Microvasc Res* 94:114–118. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2014.06.003>
36. Gabrić Pandurić D, Bago I, Katanec D, Zabkar J, Miletić I, Anić I (2012) Comparison of Er: YAG laser and surgical drill for osteotomy in oral surgery: an experimental study. *J Oral Maxillofac Surg* 70:2515–2521. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2012.06.192>
37. Blaskovic M, Gabric D, Coleman NJ, Slipper IJ, Mladenov M, Gjorgievska E (2016) Bone healing following different types of osteotomy: scanning electron microscopy (SEM) and three-dimensional SEM analyses. *Microsc Microanal* 22:1170–1178. <https://doi.org/10.1017/S1431927616011971>
38. Wei F, Liu D, Feng C, Zhang F, Yang S, Hu Y, Ding G, Wang S (2015) MicroRNA-21 mediates stretch-induced osteogenic differentiation in human periodontal ligament stem cells. *Stem Cells Dev* 24:312–319. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0191>
39. Das A, Ganesh K, Khanna S, Sen CK, Roy S (2014) Engulfment of apoptotic cells by macrophages: a role of microRNA-21 in the resolution of wound inflammation. *J Immunol* 192:1120–1129. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300613>
40. Ma X, Becker Buscaglia LE, Barker JR, Li Y (2011) MicroRNAs in NF-kappaB signaling. *J Mol Cell Biol* 3:159–166. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjr007>
41. Nakai T, Yoshimura Y, Deyama Y, Suzuki K, Iida J (2009) Mechanical stress up-regulates RANKL expression via the VEGF autocrine pathway in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Mol Med Rep* 2:229–234. https://doi.org/10.3892/mmr_00000088
42. Maloney JP, Gao L (2015) Proinflammatory cytokines increase vascular endothelial growth factor expression in alveolar epithelial cells. *Mediators Inflamm* 2015:387842–387847. <https://doi.org/10.1155/2015/387842>
43. Hu K, Olsen BR (2016) The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone*. 91:30–38. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.06.013>
44. England H, Summersgill HR, Edye ME, Rothwell NJ, Brough D (2014) Release of interleukin-1 α or interleukin-1 β depends on mechanism of cell death. *J Biol Chem* 289:15942–15950. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.557561>
45. Rosenfeldt F, Wilson M, Lee G, Kure C, Ou R, Braun L, de Haan J (2014) Oxidative stress in surgery. In: Laher I (ed) *Systems biology of free radicals and antioxidants*. Springer, Berlin, Heidelberg
46. Abid MR, Schoots IG, Spokes KC, Wu SQ, Mawhinney C, Aird WC (2004) Vascular endothelial growth factor-mediated induction of manganese superoxide dismutase occurs through redox-dependent regulation of forkhead and IkappaB/NF-kappaB. *J Biol Chem* 279:44030–44038
47. Zhang X, Ng W-L, Wang P, Tian LL, Werner E, Wang H, Doetsch P, Wang Y (2012) MicroRNA-21 modulates the levels of reactive oxygen species levels by targeting SOD3 and TNF α . *Cancer Res* 72:4707–4713. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0639>
48. Stoica SC, Dorobantu DM, Vardeu A, Biglino G, Ford KL, Bruno DV, Zakkar M, Mumford A, Angelini GD, Caputo M, Emanuelli C (2019) MicroRNAs as potential biomarkers in congenital heart surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* S0022-5223:30740–30748. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2019.03.062>
49. Zloto K, Tirosh-Wagner T, Bolkier Y, Bar-Yosef O, Vardi A, Mishali D, Nevo-Caspi Y, Paret G (2018) MiRNA-208a as a sensitive early biomarker for the postoperative course following congenital heart defect surgery. *Pediatr Cardiol* 39:1565–1571. <https://doi.org/10.1007/s00246-018-1931-7>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора МИЛАН В. ВУЧЕТИЋ

Број индекса 4017/2012

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА ПИЈЕЗОЕЛЕКТРИЧНОГ ЕФЕКТА НА ЋЕЛИЈСКЕ И МОЛЕКУЛАРНЕ МЕХАНИЗМЕ ЗАРАСТАЊА ОРАЛНОХИРУРШКЕ РАНЕ КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ДИЈАБЕТЕС МЕЛИТУСОМ ТИП 1 И 2

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

Потпис аутора

У Београду, 24.02.2021

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора МИЛАН В. ВУЧЕТИЋ

Број индекса 4017/2012

Студијски програм ДОКТОРСКЕ АКАДЕМСКЕ СТУДИЈЕ

Наслов рада ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА ПИЈЕЗОЕЛЕКТРИЧНОГ ЕФЕКТА НА
ЋЕЛИЈСКЕ И МОЛЕКУЛАРНЕ МЕХАНИЗМЕ ЗАРАСТАЊА
ОРАЛНОХИРУРШКЕ РАНЕ КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ДИЈАБЕТЕС МЕЛИТУСОМ
ТИП 1 И 2

Ментор ПРОФ. ДР БОЖИДАР БРКОВИЋ

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

У Београду, 24.02.2021

Изјава о коришћењу

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

ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА ПИЈЕЗОЕЛЕКТРИЧНОГ ЕФЕКТА НА ЋЕЛИЈСКЕ И МОЛЕКУЛАРНЕ МЕХАНИЗМЕ ЗАРАСТАЊА ОРАЛНОХИРУРШКЕ РАНЕ КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ДИЈАБЕТЕС МЕЛИТУСОМ ТИП 1 И 2

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 24.02.2021

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

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

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

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

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

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