

# **Nastavno - naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu**

Na sednici Nastavno - naučnog veća Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu od 29.

09. 2020. godine, imenovana je komisija (odluka broj 3/60) u sastavu:

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

za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom **ISPITIVANJE UTICAJA  
PIJEZOELEKTRIČNOG EFEKTA NA ĆELIJSKE I MOLEKULARNE  
MEHANIZME ZARASTANJA ORALNOHIRURŠKE RANE KOD PACIJENATA SA  
DIJABETES MELITUSOM TIP 1 i 2.**

Kandidat: dr Milan Vučetić

Mentor: Prof. dr Božidar Brković.

Imenovana Komisija je proučila doktorsku disertaciju i podnosi Nastavno - naučnom veću  
Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

## **IZVEŠTAJ**

### **A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije**

Doktorska disertacija dr Milana Vučetića pod nazivom **ISPITIVANJE UTICAJA  
PIJEZOELEKTRIČNOG EFEKTA NA ĆELIJSKE I MOLEKULARNE**

## **MEHANIZME ZARASTANJA ORALNOHIRURŠKE RANE KOD PACIJENATA SA**

**DIJABETES MELITUSOM TIP 1 i 2** je napisana na 170 strana na kojima je prikazano 16 tabela, 9 grafikona, 16 fotografija i 339 referenci iz savremene, značajne naučne literature. Disertacija sadrži: rezime na srpskom i engleskom jeziku, uvod, hipotezu, ciljeve istraživanja, materijal i metode, rezultate, diskusiju, zaključke, literaturu i biografiju.

U **Uvodu** je obrazložena primena pijezelektričnog efekta u minimalno invazivnom sečenju koštanog tkiva bez traumatskog efekta na okolne mekotkivne strukture, kao i njegove kliničke i biološke karakteristike. Nadalje, ukazano je na ćelijske i molekularne mehanizme zarastanja intraoralnog koštanog i mekog tkiva sa posebnim osvrtom na ekspresiju različitih faktora rasta, uticaj oksidativnog stresa i aktivnosti enzima antioksidativne zastite, kao i na mehanizme epigenetske kontole procesa zarastanja. Imajući u vidu da je dijabetes melitus (tip 1 i 2) udružen sa poremećajima u metabolizmu koštanog i mekog tkiva, koji se mogu manifestovati kako izmenjenom koštanom mikroarhitekturom, sklonošću ka frakturama i otežanim zarastanjem, tako i poremećajima u zarastanju mekotkivnih struktura, posebno su analizirani patofiziološki mehanizmi koji dovode do promena u sintezi faktora rasta, kao i mehanizmi njihove kontrole, kao što je oksidativni stres i epigenetska regulacija, koji mogu biti izmenjeni u uslovima DM.

**Ciljevi** prvog dela istraživanja su bili da se ispituje i uporede uticaj pijezehirurgije u odnosu na standardni pristup hirurškoj ekstrakciji simetrično impaktiranih umnjaka u donjoj vilici na kliničke parametre postoperativnog toka kod zdravih i pacijenata sa dijabetes melitus tip 1 (DM tip 1). Takođe, na ovom hirurškom modelu cilj je bio i da se ispita uticaj pijezehirurgije na ekspresiju miR-21 molekula, nivoa VEGF-a, IL-1 $\beta$  proteina i aktivnosti SOD enzima u uzorcima koštanog tkiva i uporedi sa ekspresijom ovih faktora u koštanom tkivu nakon primene standardne hirurške tehnike kod zdravih pacijenata. Ciljevi drugog dela istraživanja su bili da se ispita i uporedi uticaj pijezehirurgije i standardne hirurgije na kliničke parametre

zarastanja oralnih hirurških rana, kao i na nivoe ekspresije miR-21 molekula, VEGF, MMP-9, PTEN proteina i aktivnosti SOD enzima u uzorcima koštanog tkiva nakon komplikovanog vađenja višekorenih zuba u gornjoj vilici kod zdravih i pacijenata sa dijabetes melitus tip 2 (DM tip 2).

U poglavlju **Materijal i metode** pregledno su date karakteristike kliničkog dela istraživanja kod zdravih i pacijenata obolelih od DM tip 1 i 2, po principima *Dobre kliničke prakse*. Detaljno je izneto objašnjenje etičkog standarda primenjenog u toku istraživanja, dizajna kliničke studije, kriterijuma primenjenih u toku randomizacije i uključivanja ispitanika u studiju. Takođe, dat je jasan opis hirurških procedura, hirurških modela, ispitivanih hirurških tehnika, laboratorijskih analiza vršenih na uzorcima koštanog tkiva (imunoesejska i spektrofotometrijska metoda; lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu), načina evaluacije kliničkih intraoperativnih i postoperativnih, kao i laboratorijskih parametara istraživanja. U statističkoj obradi podataka navedeni su svi racionalno upotrebljeni statistički testovi.

**Rezultati** su grupisani prema hirurškim modelima primenjenim u ispitivanju hirurških tehnika, i to kao komparativno kontrolisano istraživanje primenjeno na modelu hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka kod zdravih i DM 1 pacijenata, i kao komparativno kontrolisano ispitivanje uticaja primenjenih tehnika na modelu komplikovane ekstrakcije višekorenih zuba u gornjoj vilici kod zdravih i DM tip 2 pacijenata. Prikazani rezultati prate postavljene ciljeve. Rezultati ispitivanih parametara u sklopu hirurških ekstrakcija impaktiranih umnjaka su grupisani kao klinički parametri postoperativnog toka (bol, otok i trizmus) kod zdravih i DM tip 1 pacijenata, i kao laboratorijski parametri (ekspresija miR-21 molekula, nivoi VEGF, IL-1 $\beta$  proteina, aktivnost SOD enzima), mereni u uzorcima koštanog tkiva zdravih pacijenata. Takođe su prikazani rezultati praćenja koeficijenta korelacije između kliničkih i laboratorijskih parametara. Rezultati drugog dela istraživanja, koje se odnosi na

praćenje zarastanja rana nakon komplikovanih vađenja višekorenih zuba kod zdravih i DM tip 2 pacijenta, su predstavljeni kao rezultati postoperativnog toka i zarastanja ekstrakcionih rana, kao i rezultati laboratorijskih parametara u koštanom tkivu (ekspresija miR-21 molekula, nivoi VEGF, MMP-9, PTEN proteina i aktivnosti SOD enzima).

U **Diskusiji** je naučnom analizom dobijenih rezultata utvrđeno da primena piježohirurgije dovodi do znatno povoljnijeg postoperativnog oporavka pacijenta nakon hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka. Analiza komparativnih rezultata laboratorijskih parametara na modelu hirurške ekstrakcije impaktiranih umnjaka ukazala je na povoljniji efekat piježohirurgije na promene u ekspresiji signalnih molekula kako na ćelijskom, tako i na molekularnom nivou ispitivanja. Takođe, analiza rezultata je ukazala da 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 signalnih molekula na ćelijskom i molekularnom nivou, kada se komplikovana ekstrakcija višekorenih zuba u gornjoj vilici vršila primenom piježohirurgije. Istovremeno, dobijeni rezultati su povezani sa nalazima dosadašnjih savremenih istraživanja u ovoj oblasti.

Na osnovu iznetih i diskutovanih rezultata predstavljeni su **zaključci** koji daju jasne odgovore na postavljene ciljeve.

U **literaturi** su navedene relevantne, savremene i značajne naučne reference, koje su citirane u radu.

## **B. Kratak opis postignutih rezultata**

Dobijeni rezultati su ukazali na znatno povoljniji postoperativni oporavak zdravih pacijenata nakon primene piježohirurgije u odnosu na standardnu hirurgiju na modelu hirurške ekstrakcije donjih impaktiranih umnjaka. Tačnije, veći intenzitet bola prvog dana, kao i izraženiji trizmus trećeg dana bili su prisutni nakon standardne hirurške ekstrakcije. Na

molekularnom nivou, pijezohirurgija je bila praćena sa povećanom ekspresijom inflamatorno-modulatorne miR-21 i smanjenim nivoom VEGF-a u alveolarnoj kosti. Rezultati korelacijskih testova su ukazali na značajnu povezanost samo molekula miR-21 u koštanom tkivu sa vremenom javljanja bola nakon hirurške intervencije. Sa druge strane, uzimajući u obzir model komplikovane ekstrakcije višekorenih zuba u gornjoj vilici, dobijeni rezultati na tkivnom nivou su pokazali da su komplikovane ekstrakcije nakon primene pijezohirurgije kod pacijenata sa DM 2 praćene značajno manjim intenzitetom bola i njegovim kasnijim javljanjem, zatim značajno boljim kliničkim izgledom i zarastanjem gingive ekstrakcione alveole u prvih sedam dana zarastanja. Takođe, analiza parametara zarastanja ekstrakcione alveole je ukazala da je indeks zarastanja na danu intervencije bio značajno manjih vrednosti nakon primene pijezohirurgije 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 pijezohirurgije. Konačno, analize stope epitelizacije ekstrakcionih alveola su pokazale da je smanjenje dijametra otvora alveole 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. 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.

### **C. Uporedna analiza doktorske disertacije**

Rezultati ove doktorske disertacije, proistekli iz kliničkog i laboratorijskog istraživanja, pokazali su uspešno zarastanje oralnohirurških rana nakon hirurškog i komplikovanog vađenja zuba, kada se kao metod koristi piježohirurški pristup kod zdravih, a posebno kod pacijenata sa DM tip 1 i 2. Naime, ključni mehanizmi koji su odgovorni za otežano i usporeno zarastanje koštanog tkiva u uslovima DM tip 1 i 2, kao što su promene u ekspresiji signalnih molekula na ćelijskom i molekularnom nivou, pokazali su značajno manja odstupanja posle primene piježohirurgije u odnosu na standardu hiruršku proceduru.

Posmatrano sa aspekta kliničkih istraživanja, rezultati ove doktorske disertacije pokazuju, po prvi put, ćelijske i molekularne mehanizme zarastanja na osnovu kojih je moguće dati relevantna objašnjenja stabilnog postoperativnog oporavka pacijenata (redukcija postoperativnog bola, broja analgetika i smanjenja trizumusa), kod kojih se oralnohirurške intervencije izvode primenom piježohirurgije, kao što je to slučaj u dosada objavljenim rezultatima u literaturi (Thomas, Puelo 2011, Barone i sar. 2010, Gangwani i sar. 2018). Uzimajući u obzir ispitivani klinički model kod DM pacijenata pokazano je, takođe, smanjenje intenziteta postoperativnog bola i njegovo kasnije javljanje, kao i značajno bolji izgled zarastanja hirurške rane posle primene piježohirurgije, što nije bio slučaju nakon primene standardnih hirurški protokola (Arnovich i sar. 2010, Huang i sar. 2013, Fernandez i sar. 2015).

Komparativna analiza zarastanja koštanog tkiva posle primene piježohirurgije u odnosu na standardnu hirurgiju je pokazala povećanu ekspresiju miR-21 nakon primene piježohirurgije, što svakako ukazuje na njen doprinos u smanjenju inflamatornog odgovora tkiva na hiruršku traumu, pošto je poznato da miR-21 ispoljava antiinflamatorna svojstva supresijom signalnih puteva (Ma i sar. 2011). Sa ciljem da se utvrdi takva pretpostavka, ispitivana je i povezanost ekspresije miR-21 u koštanom tkivu sa parametrima postoperativnog bola i trizumusa, koja je

pokazala pozitivnu korelaciju. S tim u vezi, miR-21 se pokazao kao validan biomarker početka postoperativnih tegoba nakon hirurškog vađenja zuba, što bi moglo da predstavlja novinu u savremenoj literaturi.

Savremena preporuka za praćenje rane inflamatorne reakcije u zarastanju koštanog tkiva jeste komparativna analiza nivoa VEGF-a (Marsland i sar. 2017), čije se koncentracije značajno smanjuju posle primene piježohirurgije, što je pokazano u ovoj doktorskoj disertaciji. S druge strane, kod pacijenata sa DM, na istom hirurškom modelu, nivo VEGF je bio značajno niži, a ekspresija miR-21 značajno veća u odnosu na zdrave pacijente. Kako do sada nema objavljenih studija koje analiziraju promene nivoa signalnih molekula u DM na modelu zarastanja oralnohirurške rane, dobijeni rezultati su delimično u saglasnosti sa rezultatima objavljenim na drugim biološkim modelima. Naime, smanjena ekspresija VEGF-a rezultat je hronične ishemije usled dijabetične angiomiopatije u mekom i koštanom tkivu na *in vivo* modelima (Santana i sar. 2003, Galiano i sar. 2004, Amin i sar. 2010), dok je povećana ekspresija miR-21 usko povezana sa stepenom hiperglikemije i povećanjem nivoa oksidativnog stresa (La Sala i sar. 2018).

Do sada je poznato da MMP-9 i PTEN molekule igraju važnu ulogu u fazama inflamacije i remodelacije fiziološkog procesa zarastanja, dok u DM njihova narušena funkcija može biti relevantan osnov u patogenezi otežanog zarastanja rane (Lieu i sar. 2011). Značajno smanjenje koncentracije MMP-9 i povećanje koncentracije PTEN-a u dijabetičnoj kosti, ukazuju da je povećan nivo značajnosti u ekspresiji miR-21 u negativnoj korelaciji sa koncentracijom MMP-9, dok je značajno veći nivo PTEN-a u pozitivnoj korelaciji sa stepenom dijabetičnog oksidativnog stresa, na šta su ukazala i ispitivanja Wanga i sar. (2011) na dijabetično izmenjenim koronarnim krvnim sudovima pacijenata.

Na osnovu komparativne analize dobijenih rezultata u ovoj doktorskoj disertaciji, kao i do sada objavljenih rezultata kliničkih i eksperimentalnih studija, primena piježohirurgije se

pokazala kao racionalan, minimalno invazivan metod kod pacijenata sa smanjenim kapacitetom koštanog i mekotkivnog zarastanja, kao što su pacijenti sa DM, posebno sa aspekta promena transdukcijonim signalnih mehanizama, koji su po pravilu već izmenjeni u dijabetičnim uslovima.

#### **D. Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

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. Clin Oral Investig. 2020 Jun 4. doi: 10.1007/s00784-020-03366-6.

#### **E. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija **ISPITIVANJE UTICAJA PIJEZOELEKTRIČNOG EFEKTA NA ĆELIJSKE I MOLEKULARNE MEHANIZME ZARASTANJA ORALNOHIRURŠKE RANE KOD PACIJENATA SA DIJABETES MELITUSOM TIP 1 i 2**, dr Milana Vučetića, predstavlja značajan i originalan naučni doprinos u razumevanju uticaja pijezelektričnog efekta na promene nivoa signalnih molekula i analizi transdukcionihi signalnih mehanizama procesa zarastanja oralnohirurške rane, kako kod zdravihi, tako i kod pacijenata sa DM. U radu su primenjene savremene kliničke i eksperimentalne metode za ispitivanje uticaja pijezelektričnog efekta. Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja, sa precizno definisanim ciljevima, originalnim naučnim pristupom, savremenom metodologijom rada, adekvatno prikazanim i diskutovanim rezultatima i jasno uobličanim zaključcima.

Na osnovu svega napred navedenog, i imajući u vidu objavljeni rad iz oblasti doktorske disertacije, Komisija predlaže Nastavno - naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta



u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju pod naslovom **ISPITIVANJE UTICAJA PIJEZOELEKTRIČNOG EFEKTA NA ĆELIJSKE I MOLEKULARNE MEHANIZME ZARASTANJA ORALNOHIRURŠKE RANE KOD PACIJENATA SA DIJABETES MELITUSOM TIP 1 i 2** dr Milana Vučetića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora stomatoloških nauka.

U Beogradu, 23. oktobar 2020. godine

**Članovi komisije:**

Prof. dr Aleksa Marković

---

Prof. dr Miroslav Andrić

---

Prof. dr Jelena Roganović

---

Prof. dr Branislav Bajkin

---