



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје
Стоматолошки факултет



Д-Р ФИЛИП КОНЕСКИ

**Ефектите на геранилгераниол врз меките и коскените ткива вклучени
во бисфосфонатно-поврзаната остеонекроза на вилиците (ин витро и
ин vivo студија)**

-магистерски труд-

Ментор:

Проф. д-р Даница Поповиќ-Моневска

Коментор:

Проф. д-р Ицко Ѓоргоски

Скопје, 2017



Ss. Cyril and Methodius University in Skopje
Faculty of Dentistry



DR. FILIP KONESKI

**Effects of geranylgeraniol on the soft and bone tissues involved in
bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (in vitro and in vivo
study)**

-Master thesis-

Supervisor:

Prof. Dr. Danica Popovik-Monevska

Co-supervisor:

Prof. Dr. Icko Gjorgoski

Skopje, 2017

Содржина

| | |
|--|-----------|
| АПСТРАКТ..... | 1 |
| ABSTRACT..... | 3 |
| 1. ВОВЕД И ПРЕГЛЕД ОД ЛИТЕРАТУРАТА | 5 |
| 1.1. Бисфосфонати..... | 5 |
| 1.1.1. Структура и биоактивност на бисфосфонатите | 5 |
| 1.1.2. Механизам на дејство на БФ..... | 8 |
| 1.2. Бисфосфонатно-поврзана остеонекроза на вилиците (BRONJ)..... | 9 |
| 1.2.1. Дефиниција и стадиуми на болеста..... | 9 |
| 1.2.2. Ризик фактори и епидемиологија | 11 |
| 1.2.3. Патофизиологија | 12 |
| 1.2.4. Превенција и терапија | 14 |
| 1.3. Моментални истражувања..... | 15 |
| 1.3.1. Клеточни студии | 15 |
| 1.3.2. Анимални модели | 17 |
| 2. ЦЕЛ НА ТРУДОТ | 21 |
| 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД..... | 22 |
| 3.1. Лабораториски испитувања (ин витро студија) | 22 |
| 3.1.1. Клеточни култури | 22 |
| 3.1.2. МТТ тест за клеточна пролиферација..... | 22 |
| 3.1.3. Евалуација на клеточната морфологија и структура | 23 |
| 3.2. Анимален модел (ин виво студија) | 28 |
| 3.2.1. Групирање на животните и извршени процедури | 28 |
| 3.2.2. Клиничка евалуација | 32 |
| 3.2.3. Хистолошка евалуација..... | 32 |
| 3.3. Статистичка методологија..... | 33 |
| 4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА..... | 35 |
| Клеточни култури..... | 35 |
| 4.1. Хумани епителни клетки (SG) | 35 |
| Анализа по инкубација од 3 дена | 36 |
| 4.1.1. Анализа на SG оптичка густина по 3 дена по групи при 5 μ M ZA | 36 |
| 4.1.2. Анализа на SG оптичка густина по 3 дена по групи при 25 μ M ZA | 37 |
| 4.1.3. Анализа на SG оптичка густина по 3 дена по групи при 50 μ M ZA | 38 |
| 4.1.4. Споредба на темпото на намалување на SG оптичка густина по 3 дена при | |
| различни концентрации на ZA | 39 |
| Анализа по инкубација од 7 дена | 41 |
| 4.1.5. Анализа на SG оптичка густина по 7 дена по групи при 5 μ M ZA | 41 |
| 4.1.6. Анализа на SG оптичка густина по 7 дена по групи при 25 μ M ZA | 42 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1.7. Споредба на темпото на намалување на SG оптичка густина по 3 и 7 дена | 43 |
| 4.2. Гингивални фибробласти (GN-23)..... | 44 |
| Анализа по инкубација од 3 дена | 44 |
| 4.2.1. Анализа на GN-23 оптичка густина по 3 дена по групи при 5 μ M ZA | 44 |
| 4.2.2. Анализа на GN-23 оптичка густина по 3 дена по групи при 25 μ M ZA | 45 |
| 4.2.3. Анализа на GN-23 оптичка густина по 3 дена по групи при 50 μ M ZA | 47 |
| 4.2.4. Споредба на темпото на намалување на GN-23 оптичка густина по 3 дена | 48 |
| при различни концентрации на ZA | 48 |
| Анализа по инкубација од 7 дена | 48 |
| 4.2.5. Анализа на GN-23 оптичка густина по 7 дена по групи при 5 μ M ZA | 49 |
| 4.2.6. Анализа на GN-23 оптичка густина по 7 дена по групи при 25 μ M ZA | 50 |
| 4.2.7. Споредба на темпото на намалување на GN-23 оптичка густина по 3 и 7 дена | 51 |
| при различни концентрации на ZA | 51 |
| 4.3. Споредба на темпото на намалување на SG и GN-23 оптичката | 52 |
| густина по 3 и по 7 дена при различни концентрации на ZA | 52 |
| 4.4. Микроскопска анализа на морфолошка структура..... | 53 |
| 4.5. Дискусија..... | 55 |
| Анимален модел | 60 |
| 4.6. Дескриптивна анализа по групи според тежина во шест времиња на мерење..... | 60 |
| 4.6.1. Анализа на дистрибуција на фреквенции на тежина на стаорци по групи | 60 |
| 4.6.2. Дескриптивна анализа на тежината на стаорци по групи во шест времиња на мерење..... | 62 |
| 4.7. Анализа според клиничко зараснување на екстракциона рана | 65 |
| 4.8. Патохистолошка анализа по групи | 72 |
| 4.8.1. Анализа според присуство/отсуство на хистолошка остеонекроза по групи | 74 |
| 4.8.2. Анализа според хистолошки степен на остеонекроза по групи | 76 |
| 4.8.3. Анализа според број на празни лакуни без присуство на остеоцити по групи..... | 79 |
| 4.8.4. Анализа според ткивната пролиферација по групи | 80 |
| 4.9. Дискусија..... | 82 |
| 5. ЗАКЛУЧОК..... | 87 |
| 6. РЕФЕРЕНЦИ..... | 88 |

АПСТРАКТ

Вовед: Бисфосфонатно-поврзаната остеонекроза на вилиците е сериозна компликација кај пациентите кои примаат бисфосфонати како превентивни или тераписки медикаменти за одредени состојби. Патофизиологијата на болеста не е целосно позната, но сепак постојат неколку хипотези. Остеонекрозата најчесто настанува по инвазивни стоматолошки интервенции, иако може да се јави и спонтано. Постојат протоколи за превенција и терапија на оваа состојба во зависност од нејзиниот стадиум, но таа се уште претставува проблем за успешно менаџирање. Во досегашни клеточни и анимални истражувања испитувано е дејството на золедронската киселина, како и можноста за превенција со геранилгераниол, меѓупродукт во мевалонскиот пат кој е директно инхибиран од дејството на бисфосфонатите.

Цел: Целта на трудот е да се анализира ефектот на геранилгераниолот врз ткивата вклучени во настанувањето и развојот на бисфосфонатно-поврзаната остеонекроза на вилиците.

Материјал и метод: Во делот на клеточните култури направено е испитување врз хумани епителни клетки (SG) и гингивални фибробласти (GN-23) поделени во по три групи. Контролните групи (КГ) не беа третирани со никаков препарат. Првата испитувана група (Г1) е третирана со золедронска киселина во различни концентрации, а втората испитувана група (Г2) покрај со золедронска киселина, е третирана со геранилгераниол во концентрација од 50 μM . По три и седум дена е направено тестирање на виталноста на клетките со МТТ тест, како и евалуација на морфолошката структура со светлосен микроскоп.

Анималниот модел се состои од триесет бели лабораториски стаорци поделени во три групи. Контролната група (КГ) почнувајќи од нултиот ден па се до последниот ден, еднаш неделно беше третирана со физиолошки раствор интраперитонеално, а двете испитувани групи (ИГ1 и ИГ2) со золедронска киселина во концентрација од 0,06 mg/kg. Кај стаорците од трите групи на 21 ден беше извршена екстракција на првиот молар во долната вилица. Екстракционата рана кај стаорците од ИГ2 секој ден по екстракцијата беше локално третирана со раствор на геранилгераниол во концентрација од 5mM. Беше направена евалуација на клиничкото зараснување на раната и знаци на остеонекроза, како и хистолошка евалуација за присутна остеонекроза и нејзиниот степен, број на празни лакуни и ткивна пролиферација.

Резултати: Клеточните анализи покажаа намалување на темпото на пад на оптичката густина кај двете линии клетки по три дена за различни концентрации од 5; 25 и 50 μM золедронска киселина (SG: 7,68; 26,72 и 55,21%; GN-23: 32,88; 13,18 и 31,81% од КГ) односно по седум дена за концентрации од 5 и 25 μM золедронска киселина (SG: 33,22 и 46,71%; GN-23: 17,09 и 6,21% од КГ) по додавање на геранилгераниол, во споредба со групите третирани само со золедронска киселина во соодветните раствори по три дена (SG: 21,69; 36,15% и 79,43%; GN-23: 37,61; 17,45 и 45,14% од КГ) односно по седум дена (SG: 33,27 и 60,69%; GN-23: 41,23 и 13,50% од КГ), што е подобрување од 2,82; 1,35 и 1,44, пати за разлика од Г1 кај SG клетките по три дена и за 1,14; 1,32 и 1,41 пати во споредба со Г1 од GN-23, за соодветните концентрации на золедронска киселина. Морфолошките анализи покажаа отстапување на структурата кај Г1 од двете линии клетки во споредба

со КГ, како и подобрување на структурата кај Г2 од двете линии клетки споредено со Г1, односно приближна структура како кај КГ.

Анималниот модел ги даде следните резултати: а) анализата на клиничката евалуација на екстракционата рана покажа значајна разлика меѓу ИГ-1/КГ и ИГ-1/ИГ-2 ($p < 0.05$), а незначајна разлика меѓу ИГ-2/КГ за $p > 0.05$, т.е. зараснување на раната во ИГ-2 приближно како кај КГ, за разлика од ИГ-1 каде е воочливо отежнато зараснување. б) хистолошката евалуација покажа значајни разлики меѓу ИГ-1/КГ и ИГ-1/ИГ-2 ($p < 0.05$) за присуство на остеонекроза и ткивна пролиферација, а незнајачна разлика меѓу ИГ-2/КГ за $p > 0.05$ за истите параметри. Сигнификантни разлики меѓу сите три групи ($p < 0.05$) беа забележани за параметрите број на празни лакуни без остеоцити и степен на остеонекроза, но разликата меѓу ИГ1/КГ беше поголема отколку меѓу ИГ2/КГ.

Заклучок: Додавањето на геранилгераниол на епителните клетки и гингивалните фибробласти делумно, но значајно ја подобри нивната виталност и метаболизам, како и морфолошката структура. Геранилгераниолот додаден како локален раствор во екстракционата рана кај стаорците во анималниот модел третирани со золедронска киселина и екстракција на заб значајно го подобри зараснувањето на екстракционата рана, а го намали појавувањето и степенот на хистолошки потврдена остеонекроза на вилиците, во смисла на намалување на бројот на празни лакуни без остеоцити, подобрување на васкуларизацијата и пролиферацијата на ново гранулационо ткиво. Геранилгераниолот може да биде соодветен препарат за третман и превенција на бисфосфонатно-поврзаната остеонекроза на вилиците.

ABSTRACT

Introduction: Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws is a serious complication among patients who receive bisphosphonates as preventive or therapeutic medicaments for certain conditions. The pathophysiology of the disease is not fully understood, although several hypothesis exist. The osteonecrosis usually occurs after invasive dental procedures, although it may develop spontaneously. There are protocols for prevention and treatment of this condition depending on its stage, however, a successful management is still a problem. In the existing cell and animal studies, the influence of zoledronic acid and the possibilities for prevention using geranylgeraniol, a derivate in the mevalonic pathway which is directly affected by the bisphosphonates, were tested.

Aim: The aim of this thesis is to analyze the effect of geranylgeraniol on the tissues involved in the occurrence and development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws.

Material and methods: Experiments were made on human epithelial cells (SG) and gingival fibroblasts (GN-23), each divided into three groups. The control groups (CG) were not treated with any medicament. The first group (G1) was treated with zoledronic acid in different concentrations, and the second group (G2) along with the zoledronic acid, was treated with geranylgeraniol in concentration of 50 μM . Testing of the cell viability with MTT test was made after three and seven days. In addition, an evaluation of morphological structure was made by using light microscope.

The animal model consisted of thirty white laboratory rats divided into three groups: control group (CG) was treated with saline intraperitoneally once a week, starting from the null day; while the two experimental groups (EG1 and EG2) were treated with zoledronic acid intraperitoneally in concentration of 0.06 mg/kg. On the 21st day, an extraction of the lower first molar was made in all groups. The extraction socket in the EG2 was treated with local solution of geranylgeraniol in concentration of 5mM every day. Evaluation of the clinical healing of the wound and presence of signs of osteonecrosis was performed, as well as histological evaluation for present osteonecrosis and its level, number of empty lacunes and tissue proliferation.

Results: The cell study showed a decrease in the tempo of lowering of the optic density in both cell lines in G2 after three days for different concentration of 5; 25 and 50 μM zoledronic acid (SG: 7,68; 26,72 and 55,21%; GN-23: 32,88; 13,18 and 31,81% of the CG) and after seven days for concentration of 5 and 25 μM of zoledronic acid (SG: 33,22 and 46,71%; GN-23: 17,09 and 6,21% of the CG) after adding of geranylgeraniol, compared to the G1, treated only with zoledronic acid in different concentrations after three days (SG: 21,69; 36,15% and 79,43%; GN-23: 37,61; 17,45 and 45,14% of the CG) and after seven days (SG: 33,27 and 60,69%; GN-23: 41,23 and 13,50% of the CG), which is an improvement of 2,82; 1,35 and 1,44 times compared to the G1 of SG cells after three days and 1,14; 1,32 and 1,41 times compared to the G1 of GN-23 for the given concentration of zoledronic acid. Morphological analysis showed an impaired structure in the G1 in both cell lines compared to the CG, and improvement in the structure in the G2 in both cell lines, compared to the G1 and similar structure to the cells in CG.

The results from the animal model study are as follow: a) the analysis of the clinical healing of the wound showed significant difference between EG1/CG and EG1/EG2 ($p < 0.05$), and no significant difference between EG2/CG for $p > 0.05$ which indicates that the wound healing in EG2 was nearly to that in CG, compared to the EG1 where impaired healing was observed. b)

the histological analysis showed significant differences between EG1/CG and EG1/EG2 ($p < 0.05$) for presence of osteonecrosis and tissue proliferation, while not significant difference was found between EG2/CG for the same parameters. The differences in the number of empty lacunes without osteocytes and the level of osteonecrosis were significant between all of the groups, but the difference between EG1/CG was greater than the difference between EG2/CG.

Conclusion: Adding the geranylgeraniol to the epithelial cells and gingival fibroblasts, partially, but significantly improved the cells' viability and metabolism, as well as their morphological structure. Geranylgeraniol, when added as a local solution in the extraction socket in the rats, which were previously treated with zoledronic acid, and after the tooth extraction, significantly improved the wound healing and decreased the occurrence and the level of histological osteonecrosis of the jaws, in means of lowering the number of empty lacunes without osteocytes, improved vascularity and greater proliferation of granulation tissue. Thus, geranylgeraniol may be a suitable medicament for treatment and prevention of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws.

1. ВОВЕД И ПРЕГЛЕД ОД ЛИТЕРАТУРАТА

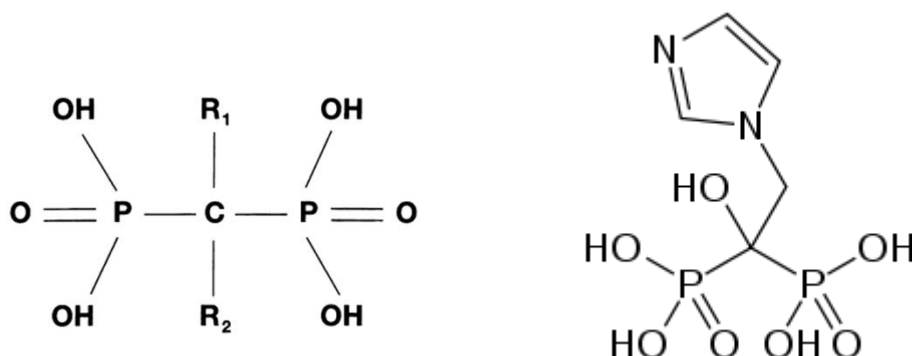
Бисфосфонатите (БФ) се широко користени препарати за превенција и третман на коскени метастази и хиперкалциемија кај малигни заболувања, како и при други ресорптивни и метаболни состојби на коските. Една од компликациите од примената на овие лекови е бисфосфонатно-поврзаната остеонекроза на вилиците (BRONJ), која најчесто се јавува по инвазивни стоматолошки процедури, иако може да се јави и спонтано, а се карактеризира со експонирана некротична коска, отежнато зараснување, болка, а често и придружна инфекција. Точниот механизам на дејство на бисфосфонатите во настанувањето на оваа состојба не е познат, па затоа постојат неколку теории за нејзината патофизиологија. До денес не постои ефикасна терапија која во целост може да ја превенира или излекува бисфосфонатно-поврзаната остеонекроза на вилиците.

Бидејќи најчесто бисфосфонатната-остеонекроза на вилиците се јавува по екстракција на заб, се претпоставува дека во нејзиното настанување улога имаат клетките кои се одговорни за заздравување на раната и за коскениот ремоделирање, кои во нормални услови се одвиваат без поголеми пречки. Тука спаѓаат епителните клетки и фибробластите кои имаат улога во заздравувањето на меките ткива, како и остеобластите и остеокластите, важни за коскениот ремоделирање. Од биохемиски и молекуларен аспект, бисфосфонатите во т.н. мевалонски пат, се вклучени во создавањето на геранилгераниол, кој е важен за нормално функционирање на претходно споменатите клетки. Истражувањата покажале дека золедронската киселина има токсични ефекти на овие клетки, токму преку намалување на создавањето на геранилгераниол, а со тоа се претпоставува дека тоа може да биде една од причините за настанување на бисфосфонатно-поврзаната остеонекроза на вилиците. Во последните неколку години се направени неколку ин витро истражувања во кои на клетките третирали со золедронска киселина им се додавал геранилгераниол, а потоа се оценувала нивната функција, во споредба со клетките кои биле третирали само со золедронска киселина. Резултатите покажале дека геранилгераниолот има влијание во намалувањето на токсичноста на овие клетки.

1.1 Бисфосфонати

1.1.1. Структура и биоактивност на бисфосфонатите

Бисфосфонатите (БФ) се антиресорптивни лекови кои дејствуваат специфично на остеокластите, со што ја одржуваат коскената густина и цврстина.¹ Постојат неколку индикации за нивна примена, вклучувајќи превенција и третман на примарна и секундарна остеопороза, состојба на хиперкалциемија, мултипен миелом и остеолиза кај коскени метастази кои потекнуваат од примарни малигни тумори, како и кај Паџетовата болест.^{2, 3, 4, 5, 6, 7, 8} БФ се синтетски аналози на пирофосфатот, кои во својот состав имаат две фосфатни групи кои делат еден атом на јаглерот (P-C-P), наместо P-O-P врската која ја има кај неорганските пирофосфати. За разлика од пирофосфатите, БФ се резистентни на ензимската хидролиза, што ја објаснува нивната акумулација во коскениот матрикс и нивниот екстремно долг полуживот.⁹ P-O-P структурата овозможува голем број различни варијанти, особено со менување на двата ланци (R1 и R2) кои се поврзани за атомот на јаглерод. Двете фосфатни групи се одговорни за врзување на БФ за хидроксиапатитот од коската, што се надополнува со R1 радикалот. На позицијата R1 може да се најде хидроксилна или аминокиселинска група, што го зголемува афинитетот за калциум, а со тоа и за коскените минерали.^{10, 11} Антиресорптивната потентност на БФ пак, е одредена од структурата и тридимензионалната конформација на страничниот R2 ланец.^{10,12} Познато е дека БФ кои содржат примарен азотен атом во алкилниот ланец, како што е алендронатот, се значајно попотентни во инхибицијата на коскената ресорпција отколку претходните генерации БФ кои не содржат азот, како што е клондронатот. БФ кои содржат терциерен азот, како што се ибандронатот и олпадронатот се уште попотентни. Ризедронатот и золедронатот се меѓу најпотентните БФ, бидејќи содржат азотен атом во хетероцикличен прстен (сл 1. и табела 1 и 2).¹³



Сл. 1. Шематски приказ на хемиската структура на бисфосфонатите (лево) и на золедронската киселина (десно)

Табела 1. Типови бисфосфонати и нивни механизми на дејство

| <i>Генерација</i> | <i>Тип</i> | <i>Пример</i> | <i>Механизам на дејство</i> |
|-------------------|----------------------------------|---|---|
| Прва | БФ без азот во составот | етидронат клодронат тилудронат | Создаваат дериват на АТФ кој ја нарушува функцијата на остеокластите и предизвикува нивна апоптоза |
| Втора | Алkil amino БФ (содржат азот) | памидронат аледронат ибандронат олпадтонат | Ја инхибираат синтезата на стероли преку мевалонскиот пат, конкретно преку инхибиција на ензимот фарнезил пирофосфоат синтаза |
| Трета | Хетероциклични БФ (содржат азот) | ризедронат золедронат | Го инхибираат ензимот фарнезил пирофосфоат синтаза и ги стабилизираат комформационите промени |

БФ- бисфосфонат; АТФ- аденозин трифосфат

Табела 2. Типови бисфосфонати и нивна потентност, индикации, администрација и дозирање

| <i>Тип на бисфосфонат</i> | <i>Потентност</i> | <i>Индикација</i> | <i>Администрација</i> | <i>Доза</i> |
|-----------------------------|-------------------|---|-----------------------|----------------------------------|
| Без азот во составот | | | | |
| етидронат | 1 | Остеопороза, Паџетова болест | Орално | До 20 мг/кг дневно |
| клодронат | 10 | Остеопороза, Паџетова болест | Орално | 1600-2500 мг дневно (до 3200 мг) |
| | | | ИВ | 300 мг дневно |
| тилудронат | 10 | Паџетова болест | Орално | 400 мг дневно |
| Со азот во составот | | | | |
| памидронат | 100 | Остеолитични коскени метастази кај карцином на дојка, остеолитични лезии кај мултипен миелом, Паџетова болест | ИВ | 90 мг на 3 недели |
| аледронат | 500 | Остеопороза, Паџетова болест | Орално | 10 мг дневно 70 мг неделно |
| ибандронат | 1000 | Остеопороза | Орално | 2,5 мг дневно 150 мг месечно |
| | | | ИВ | 3 мг на три месеци |
| ризедронат | 2000 | Остеопороза, Паџетова болест, остеолитични лезии кај мултипен миелом, хиперкалциемија кај малигнитет | Орално | 5 мг дневно 35 мг неделно |
| золедронат | 10000 | Коскени метастази од солидни тумори, остеолитични лезии кај мултипен миелом, хиперкалциемија кај малигнитет | ИВ | 4 мг на три недели |
| | | остеопороза | | 5 мг годишно |

ИВ-интравенски

Ресорпцијата на орално администрираните БФ во гастроинтестиналниот тракт е со ниска биодостапност од 0,3-0,7%, што се должи на нивната многу ниска липофилност, која спречува трансцелочен транспорт преку епителните бариери.^{14,15}

БФ комплетно се јонизираат во крвта во физиолошка рН средина (7.4). Интравенската администрација на БФ доведува до брза акумулација во коскените ткива, и тоа околу

30% за 5 минути и 60% за 1 час.¹⁶ Полуживотот во плазмата е 1-2 часа, а оваа брза елиминација се должи на акумулацијата во коската и реналниот клиренс. Еднаш инкорпорирани во коската, БФ можат повторно да се ослободат само кога коската во која се врзани се ресорбира. Според тоа, нивото на коскениот метаболизам има големо влијание врз полуживотот на БФ.¹⁷ Без разлика дали БФ се администрираат орално или парентерално, тие не се метаболизираат, туку се исфрлаат непроменети преку урината.¹⁸

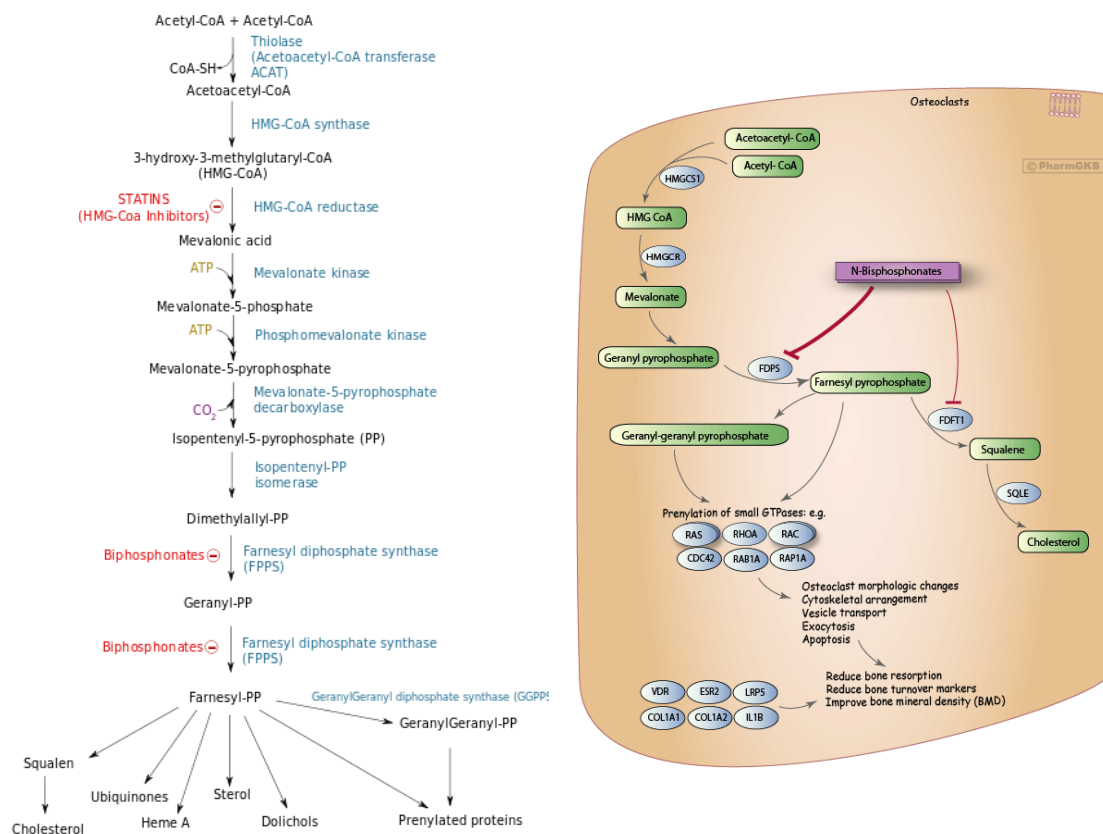
1.1.2. Механизам на дејство на БФ

БФ ја менуваат способноста на остеокластите да формираат брановидна граница, да се атхерираат за коскената површина и да ослободат протони неопходни за продолжување на коскената ресорпција.^{19,20,21} Имено, ресорпцијата на коската се случува поради киселата средина која ја предизвикуваат овие протони (рН 2-4).²² Во ваква средина БФ дисоцираат и влегуваат во клетките по пат на остеокластна ендоцитоза, што резултира со локализација на БФ во ендоцитни везикули, а потоа и во самиот цитосол.²⁰ Покрај тоа, БФ промовираат и апоптоза на остеокластите преку намалување на нивниот прогениторен развој. Губењето на ресорптивниот капацитет на остеокластите исто така делумно се должи и на испумпувањето на Н-АТФ-аза фосфатази и лизозомални ензими.^{23, 24}

БФ кои не содржат азот се инкорпорираат во нехидролизирачки аналози на аденозин трифосфат (АТФ) и се конвертираат во аналози на АТФ кои содржат метилен (АppСр тип) (табела 1). Акумулацијата на овие токсични продукти интерферира со митохондријалната функција и конечно води до апоптоза на остеокластите.^{25, 26}

БФ кои содржат азот (како што е золедронатот) делуваат преку инхибиција на фарнезил пирофосфат (FPP) синтетазата и геранилгеранил пирофосфат (GGPP) синтетазата, двата клучни ензими во мевалонскиот пат (табела 1 и слика 2). Спречувањето на сукцесивните реакции во мевалонскиот пат доведува до нарушена пренилација на протеините (додавање хидрофобни молекули), а со тоа и нарушена активација на малите GTP-ази, како што се Ras, Rho, Rac и Cdc42. Овие молекули се важни сигнални протеини кои имаат улога во регулацијата на морфологијата на остеокластите, начинот на подредување на цитоскелетот, формата на мембраната, нивната функција и преживување.^{13,27} Нивното натрупување во непсенилизирачка

форма е инкомпатибилно со нормалната функција на остеокластите.²⁸ Истражувано е и влијанието на БФ врз остеобластите. Експериментално е покажано дека БФ ја инхибираат експресијата на рецепторниот активатор на NF-каппа В лигандот (RANK-L) кај остеобласти на стаорец и хумани остаобластни клетки, што упатува на тоа дека антиресорптивниот ефект на БФ делумно е посредуван и од влијанието врз остеобластните сигнални патишта.^{29,30}



Сл. 2. Шематски приказ на мевалонскиот пат и местото на дејство на бисфосфонатите

1.2. Бисфосфонатно-поврзана остеонекроза на вилиците (BRONJ)

1.2.1 Дефиниција и стадиуми на болеста

Бисфосфонатно-поврзаната остеонекроза на вилиците е сериозна компликација која се јавува кај пациентите кои примаат бисфосфонатна терапија. Оваа состојба се дефинира како експонирана коска или коска која е поврзана со интраорална или екстраорална фистула во максилофацијалната регија која постои подолго од осум

недели, кај пациенти кои биле или се на антиресорптивна (бисфосфонатна) терапија, во отсуство на историја на радијациона терапија и метастази во вилиците.³¹

Симптомите кои се јавуваат кај BRONJ се директно зависни од стадиумот на болеста и нејзината прогресија. Американската асоцијација на орални и максилофацијални хирурзи пациентите ги категоризира според следните стадиуми на болеста³¹ (табела 3):

- Пациенти со ризик: нема некротична коска кај пациентите кои примаат интравенски или орални бисфосфонати и тие се асимптоматски;
- 0 стадиум: нема клинички видлива некротична коска, но постојат неспецифични симптоми без одонтогена етиологија или клинички или радиографски наоди кои вклучуваат расклатување на забите без хронично воспаление како причина за тоа, како и менување на трабекуларниот распоред на коската со зони на ресорпција на алвеоларниот гребен и остеосклероза;
- 1 стадиум: експонирана и некротична коска или фистула која води до коска без присутна симптоматологија и инфекција. Радиографските наоди се ограничени на алвеоларниот дел од вилицата;
- 2 стадиум: експонирана и некротична коска или фистула која води до коска со присутна инфекција и симптоматологија. Радиографските наоди се ограничени на алвеоларниот дел од вилицата;
- 3 стадиум: експонирана и некротична коска или фистула која води до коска со присутна инфекција и еден или повеќе присутни наоди од следните: експонираната некротична коска или остеолизата го надминува алвеоларниот дел од вилицата (т.е. се протега кон или до долниот раб и рамус на долната вилица или кон максиларниот синус и зигомата во горната вилица), присутна е патолошка фрактура, екстраорална фистула, ороантрална или ороназална комуникација

Табела 3. Одредување стадиум на BRONJ и стратегии за третман

| <i>Стадиум на болеста</i> | <i>Стратегија за третман</i> |
|---|---|
| Пациенти со ризик: нема видлива некротична коска кај пациенти коишто примале интравенски или орални бисфосфонати. | <ul style="list-style-type: none"> • Нема потреба од третман • Потребна е едукација на пациентите |
| Стадиум 0: нема клинички евидентна некротична коска, но постојат неспецифични клинички наоди, радиолошки промени и симптоми. | <ul style="list-style-type: none"> • Потребна е системска терапија, која подразбира аналгетици и антибиотици |

| | |
|---|--|
| <p>Стадиум 1: постои експонирана и некротична коска или фистули кои водат до коска, кај пациенти кои се асимптоматски и без присутна инфекција.</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Антибактериски раствори за уста • Клиничко следење на три месеци • Едукација на пациентите и повторно разгледување на индикациите за продолжување на бисфосфонатната терапија |
| <p>Стадиум 2: постои експонирана и некротична коска, или фистули кои водат до коска, придружени со инфекција, болка и еритем во регијата на експонираната коска, со или без пурулентна дренажа.</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Симптоматски третман со орални антибиотици • Орални антибактериски раствори • Контрола на болката • Дебридман со цел прекинување на иритацијата на меките ткива и контрола на инфекцијата |
| <p>Стадиум 3: експонирана и некротична коска или фистула која води до коска со присутна инфекција и еден или повеќе присутни наоди од следните: експонираната некротична коска или остеолизата го надминува алвеоларниот дел од вилицата (т.е. се протега кон или до долниот раб и рамус на долната вилица или кон максиларниот синус и зигомата во горната вилица), присутна е патолошка фрактура, екстраорална фистула, ороантрална или ороназална комуникација.</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Антибактериски раствори за уста • Антибиотска терапија и контрола на болката • Хируршки дебридман/ресекција со цел долготрајна палијација на инфекцијата и болката |

1.2.2. Ризик фактори и епидемиологија

Ризик факторите за појава на бисфосфонатно-поврзаната остеонекроза на вилиците може да се поделат на: фактори поврзани со медикаментот; локални фактори; демографски; системски и фактори поврзани со други медикаменти; и генетски.³¹

Факторите поврзани со медикаментот, т.е. БФ, се однесуваат на типот на неговата администрација и неговата концентрација, во зависност од индикацијата, како и времетраењето на неговата примена. Кај онколошките пациенти кои примаат золедронска киселина по интравенски пат, кумулативната инциденција на бисфосфонатно поврзаната остеонекроза на вилиците се движи меѓу 0,7%-6,7%^{32,33}, а ризикот од нејзина појава е за 50-100 пати поголем отколку ризикот кај онколошките пациенти коишто не примаат бисфосфонати.^{31,34} Инциденцијата на бисфосфонатно-поврзаната остеонекроза на вилиците се зголемува со зголемувањето на времетраењето на медикаментозната терапија. Кај онколошките пациенти коишто примаат золедронска киселина, инциденцијата се движи од 0,5-0,6% по 1 година, 0,9-1% по 2 години и 1,3% по 3 години од почетокот на бисфосфонатната терапија.³⁵ Пациентите коишто примаат бисфосфонати во третманот на остеопокроза имаат значително помал

ризик за развој на BRONJ отколку пациентите коишто примаат бисфосфонати во третманот на малигнитет, и тоа за 100 пати.³¹ Инциденцијата се движи од 0,017-0,04% кај интравенските БФ и до 0,21% кај оралните БФ по долгогодишна употреба (над 4 години) во третман на остеопороза.³¹

Главен локален ризик фактор за развој на BRONJ се дентоалвеоларните хируршки интервенции. Екстракцијата на заб била најчест настан пред појава на болеста, и тоа кај 52-61% од случаите на BRONJ.^{33,36,37} Од друга страна, ризикот за развој на остеонекроза кај онколошките пациенти по екстракција на заб варира од 1,6% до 14,8% кај интравенските бисфосфонати^{38,39,40} и 0,5% кај оралните.⁴¹

Во однос на локализацијата, некрозата најчесто се јавува во долната вилица (73%), следено со горната вилица (22,5%), но може да се јави и во двете вилици (4,5%).³⁶ Зголемен ризик за развој на BRONJ постои и кај пациентите кои носат мобилни протетички надоместоци поради константната траума на меките ткива.⁴² Друг добро познат фактор е постоење на воспалителна состојба на забите, како што е пародонталната болест или периапикална патологија.^{38,43} Кај 50% од случаите имало ваков наод,^{36,38} но бидејќи многу често терапијата на ваквите состојби е екстракција на забот, податоците треба да се земат со резерва.

Во однос на демографските карактеристики, BRONJ нешто почесто се јавува кај женскиот пол, веројатно поради индикацијата за препишување на терапијата (остеопороза, карцином на дојка) и сл.^{36,38,42,43} Ризикот е зголемен и при истовремено примање други препарати, како што се кортикостероидите и антиангиогенетските препарати.^{36,43,44} Присуството на коморбидитети исто така може да влијае на појавата на BRONJ, а главно се спомнуваат анемијата и дијабетесот.^{36,43} Типот на карцином поради кој се прима терапијата исто така покажува разлика во инциденцијата на болеста. Таа се движи од 2,5-18,6% кај пациенти со карцином на простатата, од 1-7% кај пациенти со карцином на дојка и од 2-11% кај пациентите со мултипен миелом.^{33,37,45,46,47}

Истражувањата покажале дека постои поврзаност помеѓу одредени единечни нуклеотидни полиморфизми кои се асоцирани со BRONJ. Тие главно се наоѓаат во зоните од гените кои се одговорни за коскениот метаболизам, создавањето колаген или за одредени метаболни коскени болести, како и за активноста на фарнезил дифосфат синтетазата.^{48,49,50}

1.2.3. Патофизиологија

Механизмот на настанување на остеонекротата на вилиците не е целосно познат, но постојат неколку хипотези за можната патофизиологија: намалено коскено ремоделирање како резултат на нарушена функција на остеокластите, воспаление или инфекција, инхибиција на ангиогенезата, токсичност на меките ткива, како и одредени дисфункции и нарушувања во имуниот одговор.^{31,34,51} Остеокластната теорија е поддржана пред сè од механизмот на дејство на БФ и нивната способност за менување и намалување на функцијата на остеокластите, а следствено и на коскениот метаболизам. Коската во која се има акумулирано голема количина на БФ е поосетлива на механичка траума отколку другите коски.^{52,53,54} Улогата на биофилмот и присутното воспаление и инфекција исто така се добро познати аспекти на BRONJ. Иако најчесто BRONJ се јавува по екстракција на заб, треба да се земе предвид фактот дека причината за екстракција на заб најчесто е од воспалителна природа. Бројни студии покажале присуство на различни соеви бактерии, вируси и габи во биофилмот на експонираната и некротична коска.^{55,56,57} Како и да е, покажано е дека BRONJ во одредени случаи се јавува и спонтано, т.е. без дејство на траума или отворање влезна врата за инфекција,³¹ па оваа теорија станува дискутабилна. Инхибицијата на ангиогенезата од страна на БФ е разгледувана и покажана во одредени истражувања.^{58,59} Се смета дека намалената прокрвеност на коскениот ткива придонесува во намаленото создавање нова коска, но и резултира со почеток на асептични некротични промени кои се должат на недостиг на кислород и хранливи материи потребни за клеточниот механизам.

Токсичноста на БФ врз меките ткива ја објаснува и следната теорија за патогенезата на BRONJ.^{60,61,62,63} Иако БФ примарно ги таргетира остеокластите и се врзува за хидроксиапатитот во коската, докажано е нивното негативно дејство врз меките ткива. Различните типови клетки вклучени во градбата на мукозниот и субмукозниот слој во оралната шуплина покажале намален метаболизам, виталност, а зголемен степен на апоптоза. Памидронатот значајно ја намалил пролиферацијата на клетките на оралната мукоза и заздравувањето на раната ин витро,⁶⁰ како и по локално инјектирање на аледронат пред екстракција на заб кај стаорци.^{61,63} Одредени истражувања покажуваат дека BRONJ може да е поврзана со неможност на меките ткива соодветно да заздрават.⁶⁰ Оштетувањето на алвеоларната коска од траума или други интервенции може да резултира со локално ослободување на врзаните бисфосфонати во околното ткиво. Иако доказите сè уште не се бројни, постои хипотеза дека екстракцијата на заб или носењето

протези може да доведе до траума и несоодветно заздравување на меките ткива. Како резултат на тоа, коската се експонира, што доведува до бактериска инфекција и некроза.^{42,60,63,64}

Оваа теорија всушност се заснова на неможноста на клетките да ја остварат фазата на пролиферација во заздравувањето на раната. Оваа фаза следи по инфламаторната фаза (која се карактеризира со секвентна инфилтрација на неутрофили, макрофаги и лимфоцити).^{65,66,67} Пролиферативната фаза се состои од епителна пролиферација и миграција кон провизорниот матрикс во раната (ре-епителизација). Најважните клетки кои се присутни во оваа фаза и го стимулираат капиларниот раст, создавањето колаген и создавањето гранулационо ткиво на местото на повредата се фибробластите и ендотелните клетки. Фибробластите создаваат колаген, како и глукозаминогликани и протеоглики, кои се главни компоненти на екстрацелуларниот матрикс. По фазата на пролиферација следи фазата на ремоделација, во која настанува матурација и враќање кон нормалното ткиво и која може да трае и со години. За целото време на заздравување, раната подлежи на физичка контракција, што е условено од контрактилните фибробласти (миофибробласти) кои се наоѓаат во раната.^{65,67,68} Ова ги поддржува аргументите кои се во прилог на мекоткивната хипотеза за развој на BRONJ.

1.2.4. Превенција и терапија

Постојат бројни препораки за внимателност и превенција од настанување на остеонекроза кај различни групи ризични пациенти кои примаат бисфосфонати, а кај кои треба или кај кои се извршиле инвазивни стоматолошки интервенции. Во зависност од групата на ризик и степенот на остеонекроза, овие мерки главно подразбираат избегнување на инвазивни процедури;^{31,34} кога тие се неопходни се препорачуваат минимално инвазивни интервенции, ординирање антибиотици и орални противвоспалителни раствори;^{31,34,69,70} во случај на постоечка некроза- дебридман на раната, конзервативен третман, а во одредени ситуации и хируршки третман со ресекција, проследен со соодветна реконструкција,^{71,72} како и флуоресцентно воден хируршки третман.^{73,74} (табела 3).

И покрај тоа, моментално не постои ефикасен третман за BRONJ. Бројот на случаи со оваа состојба се зголемува и таа сè уште е актуелен и сериозен клинички проблем.

1.3. Моментални истражувања

Земајќи го предвид фактот дека патогенезата и патофизиологијата на BRONJ не е целосно разјаснета, зголемувањето на бројот на пациенти со оваа состојба и недостигот на јасни превентивни и терапевски модалитети, во литературата се достапни бројни истражувања за оваа проблематика. Тие не се ограничени на само еден аспект, туку се движат во многу насоки, од клеточни, преку анимални, до клинички испитувања.

1.3.1. Клеточни студии

Одреден дел од истражувањата се насочени кон клетките на меките и коскените ткива кои се поврзани со BRONJ. Тоа е поради фактот што по екстракција на заб кај овие пациенти не настанува соодветно зараснување на раната, особено во зоните со многу тенок мукозен слој, како што е милохиоидната линија.⁶² Ова може да ја објасни клиничката слика на рана која не зараснува, комбинирана со експонирана, некротична и бактериски контаминирана коска, што води до развој на остеонекроза.

Истражувањата го докажале токсичниот ефект на золедронската киселина врз епителните клетки, гингивалните фибробласти, кератиноцитите, остеокластите и остеобластите, со тоа што го нарушуваат нивното нормално функционирање, а со тоа ја намалуваат нивната способност за соодветно зараснување на коскената и мекоткивната рана.^{76,77,78,79,80,81,82,83} Дополнето со останатите можни ефекти на бисфосфонатите, како и инфекцијата и воспалението кои се фаворизирани во услови на отежнато зараснување,^{84,85,86} ова се смета за една од причините за настанување на некрозата.

Тапака и сор. заклучиле дека золедронската киселина во концентрација од 100 μM има токсично дејство врз туморски клетки, гингивални фибробласти, гингивални мезенхимални стем и периодонтални лигаментарни клетки.⁸⁰ Tipton и сор. го испитувале ефектот на бисфосфонатите врз продукцијата на медијаторите на остеокластогенеза: RANKL, остеопротегерин и интерлеукин-6 од страна на гингивалните фибробласти и заклучиле дека истите имаат влијание врз нивната виталност, но и придонесуваат во микросредината која ја потпомага инхибицијата на коскената ресорпција и појавата на остеонекроза.⁸³ Draenert и сор. покажале токсичност на золедронската киселина во концентрација од 50 $\mu\text{mol/L}$ врз хумани

остеобласти и хумани фибробласти.⁸⁷ Ravosa и сор. преку токсичноста на золедронската киселина во различни концентрации врз оралните фибробласти и оралните епителни клетки покажале дека конкретниот бисфосфонат го отежнува зараснување на меко-ткивната рана преку блокирање на растот и капацитетот за миграција на клетките, како и надолна регулација на транскрипцијата на колагенот тип-I, кој е неопходен за депонирање гранулационо ткиво потребно за реепителизација.⁷⁶ Вакви цитотоксични ефекти и намалување на колагеното создавање биле откриени и во истражувањето на Acil и сор.⁷⁷ Преку анализа на генската експресија на неколку гени вклучени во процесот на апоптоза кај гингивалните фибробласти и кератиноцити, Scherer и сор. заклучиле дека золедронската киселина брзо и директно ги афектира оралните мукозни ткива, меѓу другото и преку индукција на генски регулираниот апоптотичен процес.⁷⁸ Намалување на бројот на витални клетки и намалување на метаболната активност, како и морфолошки алтерации биле најдени и во истражувањето на Basso и сор., кои аплицирале золедронска киселина на хумани епителни клетки и гингивални фибробласти.⁷⁹

Врз база на овие истражувања и сознанијата за влијанието на бисфосфонатите врз создавањето на геранилгераниол, направени се неколку студии во кои на клеточни култури од епителни клетки, гингивални фибробласти и остеобласти третирани со золедронска киселина им бил додаван геранилгераниол. Потоа функцијата на клетките била тестирана со лабораториски методи за проценка на виталноста на клетките, како и нивната способност за миграција и пролиферација.

Во истражувањето на Cozin и сор. бил испитуван ефектот на геранилгераниолот врз орални фибробласти кои биле третирани со различни концентрации на золедронска киселина.⁸⁸ Се покажало дека додавањето на геранилгераниол во концентрација од 50 μ M на клетките третирани со золедронска киселина ја вратило нивната пролиферација за 75% до 100% во споредба со контролната група, во зависност од концентрацијата на золедронска киселина со која биле третирани. Исто така, било забележано целосно враќање на способноста за миграција и затворање на раната на фибробластите третирани со золедронска киселина и геранилгераниол. Слични резултати се добиле и во однос на цитоскелетните испитувања на фокалните атхезии и бројот на актински влакна.⁸⁸

Rabst и сор. во своето истражување покажале дека геранилгераниолот, кога се додава на оралните кератиноцити третирани со золедронска киселина, статистички

значајно ја подобрува нивната виталност, метаболна активност и способноста за миграција, а го намалува степенот на апоптоза.⁸⁹

Ziebart и сор. направиле испитување на виталноста, миграцијата и цитоскелетната морфологија на ендотелни клетки, фибробласти и остеобласти кои биле третирани со золедронска киселина и геранилгераниол. Додавањето на геранилгераниол статистички значајно ги подобрило сите испитувани параметри кај сите групи клетки, во споредба со клетките кои биле третирани само со золедронска киселина.⁹⁰

Nagaoka и сор. покажале дека геранилгераниолот ја враќаат диференцијацијата на остеокластите и нивната мултинуклеација за време на остеокластогенезата која била инхибирана од страна на золедронската киселина. Сличен резултат се добил и во однос на експресијата на молекулите за остеокластна диференцијација и одложената коскена депозиција во екстракционите рани кај експериментални стаорци претходно третирани со золедронска киселина, а потоа со геранилгераниол.⁸¹

1.3.2. Анимални модели

BRONJ е успешно репродуцирана и преку бројни анимални модели. Разликите во методологијата применета во овие анимални модели главно се однесуваат на видот на БФ, неговата концентрација, доза, времетраење, како и дополнителните медикаменти и состојби кои може да се вклучени во настанувањето или влошувањето на состојбата. Во сите студии каде како бисфосфонат е применета золедронската киселина се покажал одреден степен на остеонекроза на вилиците кај експерименталните бели стаорци по извршена екстракција на заб. Степенот на некроза и локално оштетување бил одредуван преку клиничка, хистолошка, имунохистохемиска и рендгенолошка евалуација.

Табела 4. Преглед на експерименталните анимални модели користени за проучување на појавата на бисфосфонатно-поврзаната остеонекроза на вилиците.

| Автор и година | Тип, доза и начин на администрација на бисфосфонат | Додавање други препарати | Фактори | Процент на остеонекроза |
|--------------------------------------|--|--------------------------|------------------------------|-------------------------|
| Sonis et al., 2009 ⁹¹ | 0.075 mg ZA/kg sc | Дексаметазон (Dex) | Екстракција на заб Сутура | ZA/Dex 80% ZA 60% |
| Huja et al., 2009 ⁹² | 0,1 mg ZA/kg ip | He | He | ZA 0% |
| Senel et al., 2010 ⁶⁴ | 0,1 mg ZA/kg ip | He | He | ZA 20% |
| Kobayashi et al., 2010 ⁵⁵ | 0.250 mg ZA/kg sc | He | Екстракција на заб | ZA 0% |
| Bi et al., 2010 ⁹³ | 0.125 mg ZA/kg | Дексаметазон | Екстракција на заб | ZA/Dex/Doc 100% |

| | | | | |
|--|---|---------------------|---|--------------------------------|
| | ip | Доцетаксел (Dox) | | ZA/Dex 27% ZA 0% |
| Biasotto et al., 2010 ⁹⁴ | 0.04 mg ZA/kg iv | He | Екстракција на заб Стругање коска | ZA 100% |
| Hokugo et al., 2010 ⁹⁵ | 0.035 mg ZA/kg iv | He | Екстракција на заб Дефицит на вит. Д | ZA/деф. в. Д 66,7% ZA 14.3% |
| Lopez-Jornet et al., 2010 ⁹⁶ | 3 mg Pam/kg ip | Дексаметазон | Екстракција на заб | Pam/Dex 30% Pam 0% |
| Aguirre et al., 2010 ⁹⁷ | 0.015 mg Alen/kg ip | He | Екстракција на заб | Alen 40% |
| Maahs et al., 2011 ⁹⁸ | 0.6 mg ZA/kg ip 0.5 mg Alen/kg vo | He | Екстракција на заб | ZA 80% Alen 0% |
| Cankaya et al., 2011 ⁹⁹ | 0.075 mg ZA/kg sc | Дексаметазон | Екстракција на заб | ZA/Dex 60% |
| Aghaloo et al., 2011 ¹⁰⁰ | 0.066 mg ZA/kg ip | He | Пародонтопатија | ZA 47% |
| Marino et al., 2010 ¹⁰¹ | 0.02 mg ZA/kg iv | He | Екстракција на корен | ZA 75% |
| Aguirre et al., 2012 ¹⁰² | 0.08 mg ZA/kg iv 0.015 mg Alen/kg sc | He | Пародонтопатија | ZA 50% Alen 0% |
| Abtahi et al., 2012 ¹⁰³ | 0.2 mg Alen/kg sc | Дексаметазон | Екстракција на заб Мукозна рана | Alen/Dex 100% Alen 0% |
| Conte Neto et al., 2013 ¹⁰⁴ | 1 mg Alen/kg sc | He | Екстракција на заб | Alen 100% |
| Barba-Recreo et al., 2013 ¹⁰⁵ | 0.1 mg ZA/kg ip 0.1 mg ZA/kg iv | He | Екстракција на заб | ZA 80% ZA 25% |
| De Molon et al., 2014 ¹⁰⁶ | 0.2 mg ZA/kg ip | He | Периапикална патологија (пп) | ZA/пп 45% |
| Goberlanio de Barros Silva et al., 2015 ¹⁰⁷ | 0.04 mg ZA/kg iv 0.2 mg ZA/kg iv 1.00 mg ZA/kg iv | He | Екстракција на заб | ZA 14% ZA 100% ZA 100% |
| Jang et al., 2015 ¹⁰⁸ | 0.2 mg ZA/kg ip | He | Екстракција на заб | ZA 66.6% |
| Yang et al., 2015 ¹⁰⁹ | 0.8 mg ZA/kg iv | He | Екстракција на заб | ZA 100% |
| Zandi et al., 2016 ¹¹⁰ | 0.06 mg ZA/kg ip | He | Екстракција на заб | ZA 96% |

ZA- золедронска киселина; Pam- памидронат; Alen- аледронат; sc- субкутана администрација; ip- интраперитонеална администрација; iv- интравенска администрација; vo- орална администрација; Dex- дексаметазон; Dox- доцетаксел; деф. в. Д- дефицит на витамин Д

Zandi и сор. покажале дека остеонекрозата на вилиците, намаленото создавање нова коска и присуството на фистули статистички значајно се јавуваат кај стаорците третирани со золедронска киселина во концентрација од 0,06 мг/кг интраперитонеално, кај кои била извршена екстракција по три недели од започнувањето на експериментот, а еутаназијата била извршена две недели по екстракцијата.¹¹⁰

Слични резултати добиле и Maahs и сор.⁹⁸ Остеонекроза на вилиците во висок степен била забележана и кај анималните модели кај кои покрај золедронска киселина бил администриран и дексаметазон,^{91,93} а de Molon и сор. покажале и спонтано јавување на остеонекроза кај стаорци третирани со многу високи дози на золедронска киселина.¹⁰⁶ Córdova и сор. во своето истражување покажале дека за јавување на

остеонекрозата поврзана со примена на бисфосфонати централна улога има дисбалансот помеѓу клетките одговорни за остеогенеза и клетките одговорни за ресорпција.¹¹¹

De Molon и сор. пак од своето истражување заклучиле дека прекинувањето на бисфосфонатната терапија пред изведувањето на инвазивна стоматолошка интервенција не придонесува во намалување на степенот на остеонекроза на вилиците.¹¹²

Влијанието на геранилгераниолот врз ткивата вклучени во појавата и развојот на бисфосфонатно-поврзаната остеонекроза на вилиците до сега е испитано само на еден анимален модел. Nagaoka и сор. во конкретното истражување покажале дека интравенското администрирање на геранилгераниол кај стаорците третирани со золедронска киселина ги намалува ефектите на инхибиција на коскена депозиција предизвикани од бисфосфонатот, по екстракција на заб.⁸¹

Од прегледот на литературните податоци јасно се гледа дека геранилгераниолот има потенцијал целосно или делумно да ја врати функцијата на клетките кои се вклучени во мекоткивното и коскеното заздравување на постекстракционата рана. Како и да е, покрај лабораториските испитувања на клеточни култури, потребни се дополнителни истражувања, пред сè на анимални модели, кои ќе ги потврдат позитивните ефекти на геранилгераниолот и перспективно ќе отворат нови потенцијални методи и протоколи за превенција од настанување на BRONJ.

Главниот мотив за ова истражување пред сè беше недоволно разјаснетиот механизам на настанување на BRONJ, како и тоа што првичните сознанија добиени од лабораториските испитувања на клеточни култури сè уште не се потврдени ниту со клинички студии, ниту со развивање на анимален модел. Можните позитивни ефекти кои би ги имал геранилгераниолот во вид на раствор кој по екстракција на заб би се додавал локално, би биле цврста основа за понатамошни истражувања во оваа област и изнаоѓање на соодветни превентивни и тераписки модалитети на оваа сериозна состојба, која значајно го намалува квалитетот на живот кај пациентите.

Идејата на овој труд е да се докаже влијанието на геранилгераниолот во намалувањето на токсичноста на епителните клетки и гингивалните фибробласти предизвикана од золедронска киселина, како и неговите ефекти врз меките и коскени ткива кои се вклучени во настанувањето на бисфосфонатно-поврзаната остеонекроза на вилиците по екстракција на заб кај претходно третирани експериментални животни

(бел стаорец) со золедронска киселина. Ако основните функции на овие клетки по додавањето на геранилгераниол се подобрат, може да се очекува соодветно зараснување на раната, т.е. заздравување на меките ткива, а со тоа и намалување на можноста од воспаление и инфекција, како едни од директните фактори за настанување и влошување на состојбата. Дополнително, со враќањето на функцијата на остеокластите и остеобластите, повторно би се воспоставила рамнотежата во коскениот ремоделирање и коскениот метаболизам во вилиците.

2. ЦЕЛ НА ТРУДОТ

Главната цел на овој труд е да се анализира ефектот на геранилгераниолот врз ткивата вклучени во настанувањето и развојот на бисфосфонатно-поврзаната остеонекроза на вилиците.

Специфични цели на трудот се:

- Да се одреди токсичниот ефект на золедронската киселина врз хуманите епителни клетки и гингивалните фибробласти;
- Да се оцени влијанието на геранилгераниолот врз намалување на токсичните ефекти предизвикани од золедронската киселина врз хуманите епителни клетки и гингивални фибробласти;
- Да се одреди влијанието на золедронската киселина во настанувањето на клинички видлива бисфосфонатно-поврзана остеонекроза на вилиците по екстракција на заб кај експериментални животни;
- Да се процени ефектот на геранилгераниолот во форма на раствор врз процесот на заздравување на екстракционата рана, аплициран локално по екстракција на заб кај експериментални животни третирани со золедронска киселина;
- Да се утврдат патохистолошките промени на коската кај експерименталните животни третирани со золедронска киселина и геранилгераниол по екстракција на заб во споредба со експерименталните животни третирани само со золедронска киселина;

Работната хипотеза е: Геранилгераниолот го намалува токсичниот ефект кој го предизвикува золедронската киселина на меките ткива и коската, а со тоа го превенира развојот на бисфосфонатно-поврзаната остеонекроза на вилиците.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

3.1. Лабораториски испитувања (ин витро студија)

3.1.1. Клеточни култури

Во студијата се вклучени две линии на клеточни култури: хумани епителни клетки (SG) и гингивални фибробласти (GN-23) врз кои беа изведени два одделни експерименти. Секоја од клеточните култури беше поделена на неколку групи:

- контролна група: само клетки во соодветен медиум – DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)
- 1. испитувана група: клетки третирани со золедронска киселина (Zoledronic acid, Sigma Aldrich Corp., St Louis, MO, USA) во концентрации од 5, 25 и 50 μM , поделени во соодветни подгрупи^{76,77,78,81,88,90}
- 2. испитувана група: клетки третирани со золедронска киселина во различните концентрации и геранилгераниол (Geranylgeraniol, Sigma Aldrich Corp., St Louis, MO, USA) во концентрација од 50 μM ^{81,88,89,90}

3.1.2. MTT тест за клеточна пролиферација

Подготовките на клеточните култури беа правени во соодветни кабинети за работа со клетки (слика 3а). Клетките беа култивирани до конфлуентност во пластични контејнери за клетки (слика 3б), по што соодветните групи беа третирани со соодветните концентрации на раствори (слики 4, 5 и 6). Растворите беа подготвени по претходно предвидени протоколи и во предвидените концентрации, по што беа соодветно стерилизирани со филтри за клеточни култури (слика 3в). Броњето на клетките се направи со дигитален читач на клетки, кои беа поставени во пластични плочки со по две комори (слика 3г). Клетките беа поставени во пластични лабораториски плочки со 96 жлеба во раствор од 100 μL и количина од 1×10^5 , и тоа на принцип на трипликација. Инкубацијата беше извршена во инкубатор на 37°C, во средина со 5% CO₂ во времетраење од 3 и 7 дена. Во плочката каде испитувањето траеше 7 дена, концентрацијата на золедронската киселина беше 5 и 25 μM , а растворите беа заменети со свежи на третиот ден од почетокот на експериментот. За да

се исклучи влијание на растворувачите на препаратите користени во експериментот (етанол, DMEM, DMSO), беа формирани дополнителни контролни групи во кои се направија сите можни комбинации на клетки со растворувач и истите беа поставени во плочката која ќе биде инкубирана (слики 4 и 5).

По соодветниот период на инкубација (3, односно 7 дена) беше извршено тестирање на виталноста на клетките со помош на MTT сетот за клеточна пролиферација (Cell proliferation kit)(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).^{89,90,113} Овој сет се бзира на конверзијата на жолтиот тетразолиум MTT во виолетови кристали на формазан поради метаболната активност на клетките. Клеточната редукција ги вклучува пиридин нуклеотидните кофактори NADH и NADPH. Создадените формазански кристали се растворливи, што резултира во промена на бојата која може да се квантифицира со скенирање на плочката во спектрофотометар (ELISA читач). Со тоа се одредува метаболната активност на клетките, т.е. нивната виталност.¹¹³

По инкубацијата, во секоја од плочките се додаде 10 μ L од маркерот (labeling agent), по што следеше повторна инкубација во истите услови, во времетраење од 4 часа. Потоа се додаде растворувачот од сетот во количина од 100 μ L. Плочките се инкубираа во инкубатор за време на едно деноноќие. По изминатиот период на инкубација, плочките се проверија за променета боја и истите се поставија во спектрофотометар (Spectro Star Nano, BMG Labtech), по што беше извршено мерење и читање на оптичката густина на бранова должина од 570 nm.¹¹³ (слика 6г)

3.1.3. Евалуација на клеточната морфологија и структура

Во плочки со шест жлеба беа поставени соодветните контролни и испитувани групи на клетки (слика 7 и 8а), по што по соодветните периоди на инкубација беше извршена евалуација на клеточната морфологија и структура со светлосен микроскоп (Axio Scope A1 Microscope, Zeiss, Germany)(слика 8б) со зголемување од x100, x200 и x400. Репрезентативните слики беа фотографирани со камера поврзана со микроскопот со соодветен софтвер.

Испитувањата на клеточните култури беа извршени во лабораториите Craniofacial Research Center и Bioscience Research Center, University of Tennessee Health Science Center, College of Dentistry, Memphis, Tennessee, USA.



а)



б)



в)



г)

Сл. 3. а) Кабинет за работа со клеточни култури; б) Работа со клеточни култури; в) филтри за стерилизирање клеточни култури; г) дигитален читач на клетки

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| A | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| B | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| C | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| D | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| E | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| F | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| G | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| H | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |

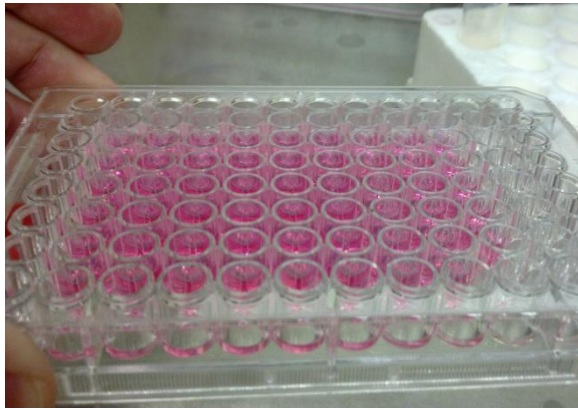
S-G cells : епителни клетки; ZA- золедронска киселина; GGOH- геранилгеранол;

Сл. 4. Шематски приказ на распоредот на епителните клетки и растворите во плочката

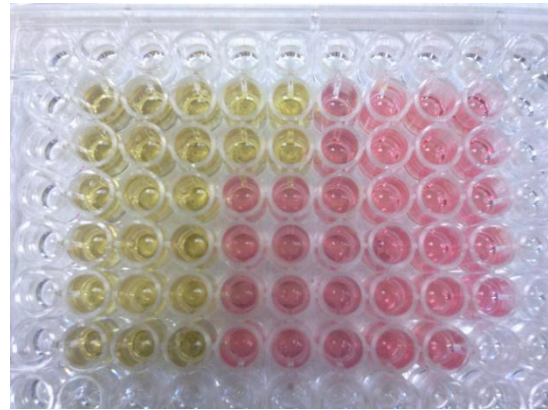
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|-----------------------------------|---|---|---|--|---|---------|---|----|----|----|
| A | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| B | ○ | GN-23 cells in DMEM ○ | ○ | ○ | ○ | GN-23 cells + Dexrazoxane ○ | ○ | ZA ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| C | ○ | GN-23 cells + ethanol ○ | ○ | ○ | ○ | GN-23 cells + GGOH + Dexrazoxane ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| D | ○ | GN-23 cells + DMSO ○ | ○ | ○ | ○ | GN-23 cells + ZA + GGOH ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| E | ○ | GN-23 cells + ethanol + DMSO ○ | ○ | ○ | ○ | GN-23 cells + ZA + Dexrazoxane ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| F | ○ | GN-23 cells + ZA ○ | ○ | ○ | ○ | GN-23 cells + ZA + GGOH + Dexrazoxane ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| G | ○ | GN-23 cells + GGOH ○ | ○ | ○ | ○ | GN-23 cells + ZA + ethanol + DMSO ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |

GN-23 cells – гингивални фибробласти; ZA- золедронска киселина; GGOH- геранилгераниол;

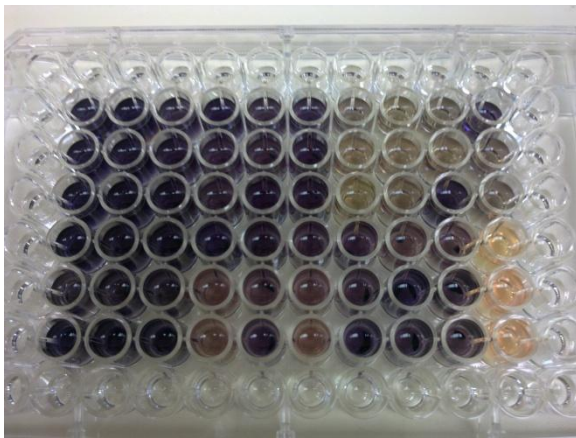
Сл. 5. Шематски приказ на распоредот на гингивалните фибробласти и растворите во плочката



а)



б)









в)









г)

Сл. 6. а) Поставени клетки во соодветен раствор во плочка; б) Изглед на плочката со клетките по додавање на МТТ реagensите; в) Изглед на плочката по последната инкубација; г) Спектрофотометар Spectro Star Nano, BMG Labtech

| | | |
|---|--|--|
| 1 SG cells + DMEM  | 2 SG cells + ethanol  | 3 SG cells + DMSO  |
| 4 SG cells + ZA  | 5 SG cells + GGOH  | 6 GN-23 cells + DMEM  |

Плочка за микроскопска евалуација бр. 1

| | | |
|---|--|--|
| 1 GN-23 cells + ethanol  | 2 GN-23 cells + DMSO  | 3 GN-23 cells + ZA  |
| 4 GN-23 cells + ZA + GGOH  | 5  | 6  |

Плочка за микроскопска евалуација бр. 2

Сл. 7. Шематски приказ на плочките за поставување клетки за микроскопска евалуација



а)



б)

Сл. 8. а) Плочка со поставени клетки во раствор за микроскопска евалуација; б) Axio Scope A1 Microscope за клеточна евалуација

3.2. Анимален модел (ин виво студија)

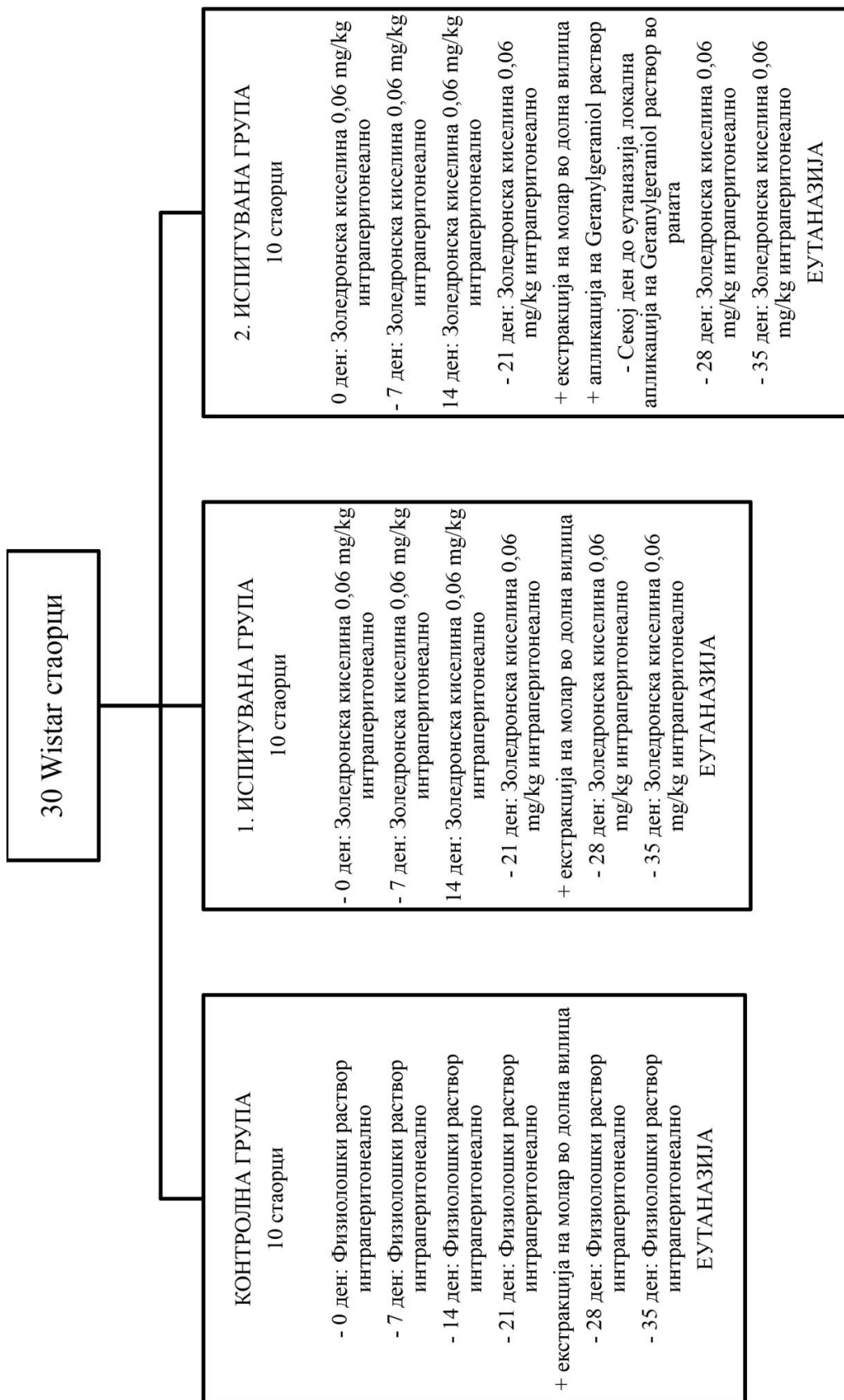
Сите испитувања кои се направија врз експериментални животни беа во согласност со етичките принципи за работа со експериментални животни, со претходно добиена согласност од Етичката комисија при УКИМ- Стоматолошки факултет во Скопје.

3.2.1. Групирање на животните и извршени процедури

Во студијата беа извршени експерименти врз вкупно 30 експериментални животни од типот бел лабораториски стаорец (Wistar), машки пол, со старост од 4 месеци и тежина од 150-300 грама.¹¹⁰

Стаорците беа поделени во три групи (една контролна и две испитувани групи), секоја составена од по 10 животни, а експериментите беа вршени по претходна аклиматизација, со 24 часовен циклус на живот (светло-темно) и храна *ad libitum*. Во текот на експериментот, секоја недела беше проверувана тежината на стаорците и начинот на поднесување на експериментот.

Протоколот по кој беше извршуван експериментот е прикажан на слика 9. Групите беа третирани на 0, 7, 14, 21, 28 и 35 ден со соодветни раствори и постапки. Контролната група беше третирана со апликација на физиолошки раствор во количина од 0,5 мл интраперитонеално. Двете испитувани групи беа третирани со апликација на золедронска киселина (Zolnat[®], 4mg/5ml, Mustafa Nevzat Ilac Sanayii A.S., Istanbul, Turkey)(слика 10) во концентрација од 0,06 мг/кг и количина на растворот од 0,5 мл, интраперитонеално (слика 11а). Кај стаорците од сите групи, на 21. ден од експериментот беше извршена екстракција на првиот молар во долната вилица десно (слика 12). Екстракцијата беше извршена под општа анестезија со Кетамин во концентрација од 80 мг/кг, со примена на остра сонда и клешта за млечни заби. По извршената екстракција, на стаорците од втората испитувана група, секој ден локално на екстракционата рана им беше аплициран раствор од геранилгераниол (Sigma-Aldrich) во концентрација од 5 mM (слика 11б). На 36 ден од експериментот кај сите стаорци беше извршена еутаназија и екстирпација на вилиците (слика 13).



Сл. 9. Шематски приказ на протоколот за анималниот модел



Сл. 10. Растворот на золедронска киселина беше индивидуално подготвен за секој стаорец врз основа на тежината на денот на аплицирањето



а)



б)

Сл. 11. а) Интраперитонеална апликација на раствори; б) локална апликација на раствор на геранилгераниол



Сл. 12. Инструментариум и постапка на екстракција на заб по дадена општа анестезија



Сл. 13. Фиксирање на екстирпираниите вилицы во раствор на формалин во обележани пластични флакони

3.2.2. Клиничка евалуација

Веднаш по екстирпацијата беше направена клиничка евалуација на вилиците за проценка на присутната екстракциона рана, степен на зараснување, експонирана коска, инфекција и воспаление. Степенот на клиничките параметри беше вреднуван на скала од 0-3, со што 0 означува отсуство на клинички знаци, а 3 означува силно присуство на клинички знаци на отежнато зараснување на раната и/или знаци на присутна остеонекроза. Евалуацијата беше направена по принципот на слепа проба од истражувачот и еден максилофацијален хирург од Клиниката за максилофацијална хирургија и Катедрата за максилофацијална хирургија на Стоматолошкиот факултет при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје.

3.2.3. Хистолошка евалуација

Вилиците беа фиксирани во 10% формалин, по што следеше декалцификација во трихлороцетна киселина, потопување во парафин и изготвување на пресеци со дебелина од 4 μ m во буколингвален правец (во делот на извадените заби). Боењето беше извршено со хематоксилин и еозин (H&E), по што се направи патохистолошка анализа со помош на микроскоп Nikon eclipse 80i и соодветен софтвер за фотографирање на репрезентативните пресеци (слика 14).

Патохистолошката анализа беше направена од страна на искусен патолог на принципот на слепа проба за следните параметри: присуство на остеонекроза (број на

празни лакуни без присуство на остеоцити поголем од 8), воспаление, создавање нова коска, гранулационо ткиво, степен на васкуларност и епителна пролиферација.



Сл. 14. Nikon eclipse 80i микроскоп поврзан со камера и компјутерски софтвер

Експерименталниот анимален модел беше спроведен во акредитираната лабораторија за работа со експериментални животни при Институтот за биологија на Природно-математичкиот факултет при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје. Патохистолошките подготовки и анализи се направија во лабораторијата при Институтот за патологија на Медицинскиот факултет при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје.

3.3. Статистичка методологија

Сите добиени резултати и секоја постапка и промена во текот на експериментот беа уредно евидентирани и сумирани. Статистичката обработка на податоците беше извршена во софтверскиот програм IBM SPSS Statistics 20, Chicago, Illinois: SPSS Inc. со примена на соодветните параметарски и непараметарски тестови во зависност од типот на податоците (нумерички или атрибутивни) и нивната дистрибуција. Покрај дескриптивната статистика за сите испитувања, беше спроведена анализа на темпо на пораст и пад на оптичката густина кај клеточните култури, а кај анималниот модел

податоците во зависност од нивниот тип и распределба беа анализирани со Shapiro-Wilk, Kruskal-Wallis H test, Mann Whitney U test, Fisher-Freeman-Halton exact test и Fisher exact two tailed test.

За сигнификантна вредност се смета $p < 0.05$. Резултатите и статистичките податоци се прикажани табеларно, графички и сликовито.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Истражувањето претставува проспективна клиничка студија имплементирана во две етапи и тоа: а) фаза на лабораториски испитувања и б) фаза на анимален модел. За исполнување на целите на истражувањето користени се податоци добиени од согледувањата на главниот истражувач и вклучените експерти во одредените области.

Испитувањата на клеточните култури се извршени во Craniofacial Research Center и Bioscience Research Center, University of Tennessee Health Science Center, College of Dentistry, Memphis, Tennessee, USA.

Експерименталниот анимален модел е изведен во акредитираната лабораторија за работа со експериментални животни при Институтот за биологија на Природно-математичкиот факултет при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје. Патохистолошките подготовки и анализи се направени во лабораторијата при Институтот за патологија на Медицинскиот факултет при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје. Клиничката евалуација е направена на Клиниката и Катедрата за максилофацијална хирургија на Стоматолошкиот факултет при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје.

Клеточни култури

Во истражувањето се вклучени две линии на клеточни култури и тоа: хумани епителни клетки (SG) и гингивални фибробласти (GN-23). Секоја од клеточните култури е поделена на три групи: а) КОНТРОЛНА ГРУПА (SG) - само клетки во соодветен медиум – DMEM); б) ИСПИТУВАНА ГРУПА (SG+ZA) - клетки третирани со золедронска киселина во концентрации од 5, 25 и 50 μM ; и в) ИСПИТУВАНА ГРУПА (SG+ZA+GGOH) - клетки третирани со золедронска киселина во различните концентрации и геранилгераниол во концентрација од 50 μM . Секоја од трите групи е поделена во соодветни подгрупи. По период на инкубација од 3 односно 7 дена, направено е тестирање на виталноста на клетките со помош на МТТ сет за клеточна пролиферација.

4.1. Хумани епителни клетки (SG)

За исполнување на целите на истражувањето, направена е анализа на оптичката густина на хуманите епителни клетки од трите групи (SG, SG+ZA, и SG+ZA+GGOH)

согласно концентрациите од 5, 25 и 50 μM на аплицираната золедронска киселина и геранилгераниол во концентрација од 50 μM . Анализата е правена по период на инкубација од 3 односно 7 дена.

Анализа по инкубација од 3 дена

4.1.1. Анализа на SG оптичка густина по 3 дена по групи при 5 μM ZA

Согласно Табела 5, при 5 μM ZA, просечните вредности на SG оптичката густина по инкубација од 3 дена во трите групи (SG, SG+ZA, и SG+ZA+GGOH) изнесуваат консеквентно 2,448 v.s 1,917 v.s 2,261. Споредбената анализа укажа на темпо на намалување на оптичката густина во втората (SG+ZA) односно третата група (SG+ZA+GGOH) во однос на првата група (SG) за консеквентно 21,69% v.s 7,68%.

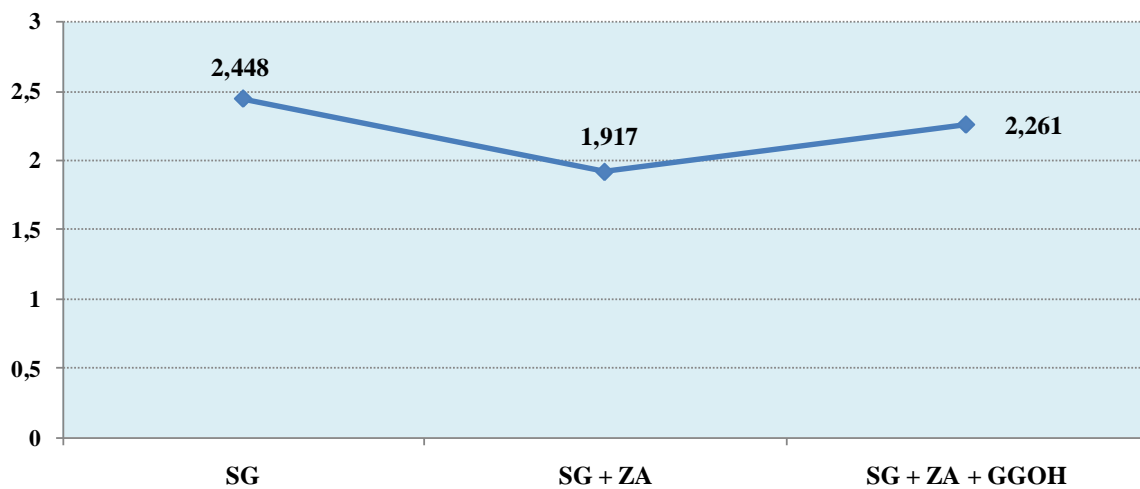
Дополнителната анализа укажа дека присуството на геранилгераниолот во концентрација од 50 μM , по период на инкубација од 3 дена, резултирало со темпо на зголемување на оптичката густина во третата група (SG+ZA+GGOH) во однос на втората (SG+ZA) за 17,94%.

Табела 5. Анализа на SG оптичка густина по 3 дена по групи при 5 μM ZA

| Групи | ОПТИЧКА ГУСТИНА ПО 3 ДЕНА 5 μM ZA | | |
|------------|---|------------------------------------|------------------------------------|
| | Просек (means) | Темпо на опаѓање/растење (%) | Темпо на опаѓање/растење (%) |
| SG | 2,448 | Реф. | - |
| SG+ZA | 1,917 | ↓ 21,69% | Реф. |
| SG+ZA+GGOH | 2,261 | ↓ 7,68% | ↑ 17,94% |

Графичкиот приказ на просечните вредности на SG оптичката густина при 5 μM ZA по инкубација од 3 дена во трите групи (SG, SG+ZA, и SG+ZA+GGOH) е даден на График 1 подолу во текстот.

График 1. Просечни вредности на SG оптичка густина по 3 дена по групи при 5 μM ZA



4.1.2. Анализа на SG оптичка густина по 3 дена по групи при 25 μM ZA

Согласно Табела 6, при концентрација од 25 μM ZA, просечните вредности на SG оптичката густина по инкубација од 3 дена во трите групи (SG, SG+ZA, и SG+ZA+GGOH) изнесуваат консеквентно 2,448 v.s 1,563 v.s 1,794.

Направената анализа укажа на намалување на темпото на оптичката густина во втората (SG+ZA) односно третата група (SG+ZA+GGOH) во однос на првата група (SG) за консеквентно 36,15% v.s 26,72% (Табела 6).

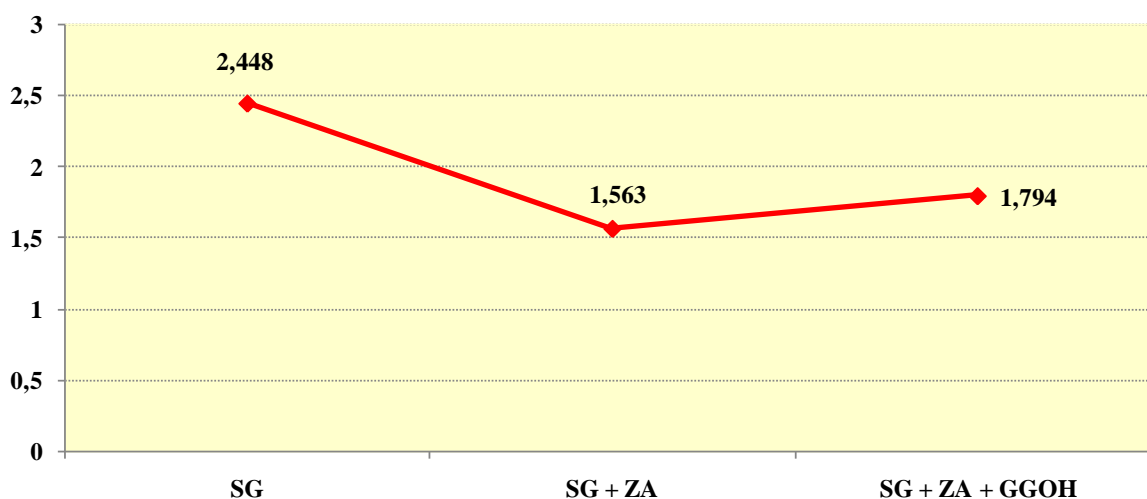
Дополнителната анализа укажа дека геранилгераниолот во концентрација од 50 μM , по период на инкубација од 3 дена, делувал на темпо на зголемување на оптичката густина во третата група (SG+ZA+GGOH) во однос на втората (SG+ZA) за 14,78% (Табела 6).

Графичкиот приказ на просечните вредности на SG оптичката густина при 25 μM ZA по инкубација од 3 дена во трите групи (SG, SG+ZA, и SG+ZA+GGOH) е даден на График 2 подолу во текстот.

Табела 6. Анализа на SG оптичка густина по 3 дена по групи при 25 μM ZA

| Групи | ОПТИЧКА ГУСТИНА ПО 3 ДЕНА 25 μM ZA | | |
|------------|--|------------------------------------|------------------------------------|
| | Просек (means) | Темпо на опаѓање/растење (%) | Темпо на опаѓање/растење (%) |
| SG | 2,448 | Реф. | - |
| SG+ZA | 1,563 | ↓ 36,15% | Реф. |
| SG+ZA+GGOH | 1,794 | ↓ 26,72% | ↑ 14,78% |

График 2. Просечни вредности на SG оптичка густина по 3 дена по групи при 25 μM ZA



4.1.3. Анализа на SG оптичка густина по 3 дена по групи при 50 μM ZA

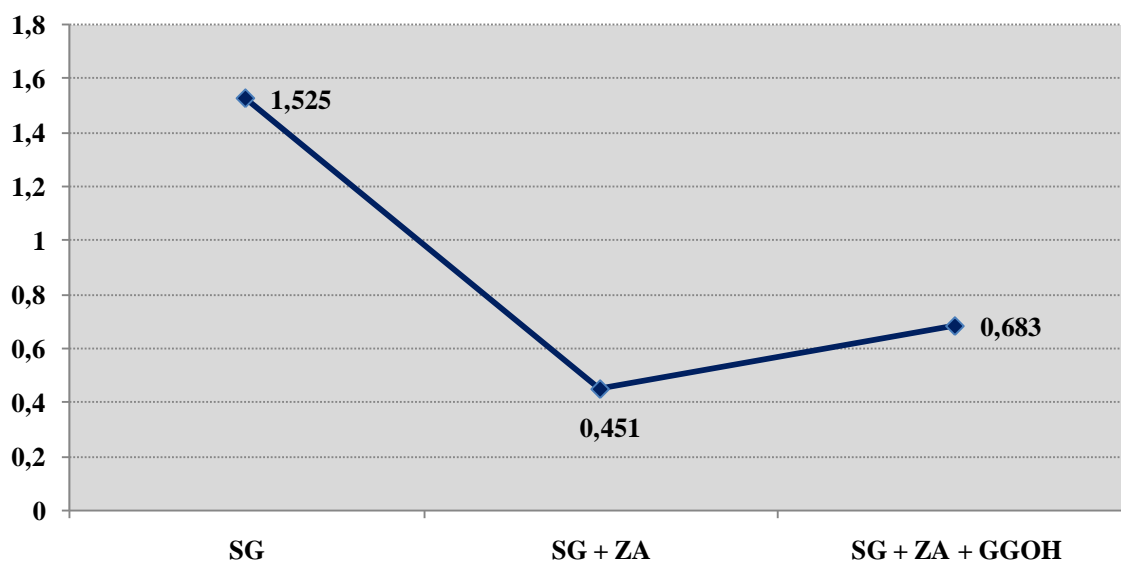
При 50 μM ZA, просечните вредности на SG оптичката густина по инкубација од 3 дена во трите групи (SG, SG+ZA, и SG+ZA+GGOH) изнесуваат консеквентно 1,525 v.s 0,451 v.s 0,683 (Табела 7 и График 3).

Анализата укажа на темпо на намалување на оптичката густина во втората (SG+ZA) односно третата група (SG+ZA+GGOH) во однос на првата група (SG) за консеквентно 79,43% v.s 55,21%. Дополнителната анализа укажа на поголема просечна оптичката густина во третата група (SG+ZA+GGOH) во однос на втората (SG+ZA) за 51,44% што се должи на присуството на геранилгераниолот во концентрација од 50 μM .

Табела 7. Анализа на SG оптичка густина по 3 дена по групи при 50 μM ZA

| Групи | ОПТИЧКА ГУСТИНА ПО 3 ДЕНА 50 μM ZA | | |
|------------|--|------------------------------------|------------------------------------|
| | Просек (means) | Темпо на опаѓање/растење (%) | Темпо на опаѓање/растење (%) |
| SG | 1,525 | Реф. | - |
| SG+ZA | 0,451 | ↓ 79,43% | Реф. |
| SG+ZA+GGOH | 0,683 | ↓ 55,21% | ↑ 51,44% |

График 3. Просечни вредности на SG оптичка густина по 3 дена по групи при 50 μM ZA



4.1.4. Споредба на темпото на намалување на SG оптичка густина по 3 дена при различни концентрации на ZA

По инкубација од три дена, направена е анализа во однос на темпото на намалување на оптичката густина на хуманите епителни клетки по третирање со золедронска киселина во концентрации од 5, 25 и 50 μM и геранилгераниолот во концентрација од 50 μM (Табела 8 и График 4).

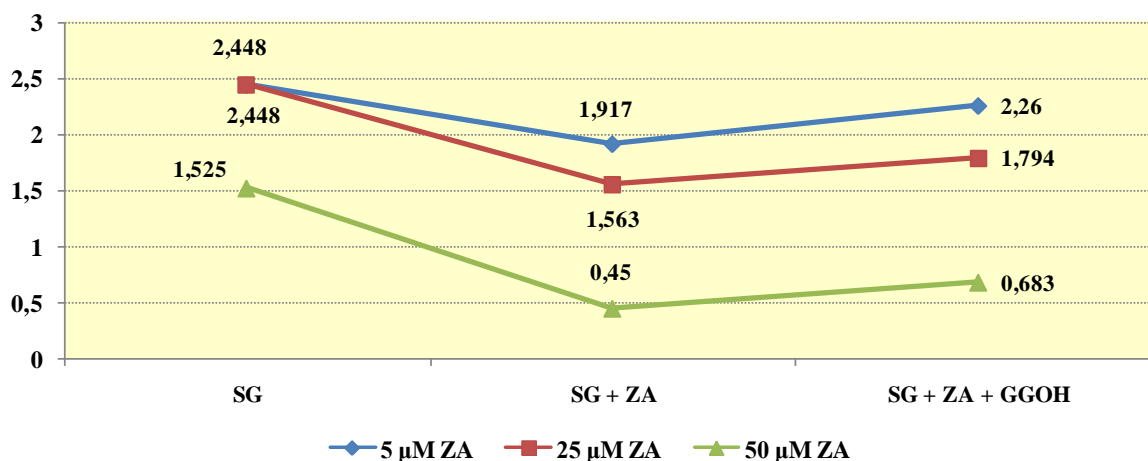
Табела 8. Темпо на намалување на SG оптичка густина по 3 дена

| Групи | ОПТИЧКА ГУСТИНА ПО 3 ДЕНА - темпо на намалување (%) - | | |
|------------|--|---------------------|---------------------|
| | 5 μM ZA | 25 μM ZA | 50 μM ZA |
| SG | Реф. | Реф. | Реф. |
| SG+ZA | ↓ 21,69% | ↓ 36,15% | ↓ 79,43% |
| SG+ZA+GGOH | ↓ 7,68% | ↓ 26,72% | ↓ 55,21% |

Темпото на намалување на оптичката густина расте со концентрацијата на ZA. Со зголемување на концентрациите на золедронската киселина од 5, 25 и 50 μM , на ниво на групата SG+ZA во однос на групата SG, утврдено е темпо на намалување на оптичката густина за консеквентно 21,69% v.s 36,15% v.s 79,43%.

Согледано е дека геранилгераниолот во концентрација од 50 μM , делува на впечатливо помало темпо на намалување на SG оптичката густина на ниво на групата SG+ZA+GGOH во однос на групата SG за консеквентно 7,68% v.s 26,72% v.s 55,21% што преставува за 2,82 v.s 1,35 v.s 1,44 пати поголема просечна SG оптичка густина споредено со групата SG+ZA (Табела 8).

График 4. Просечни вредности на SG оптичка густина по 3 дена по групи



Анализа по инкубација од 7 дена

Во рамките на истражувањето, по инкубација од 7 дена, направена е анализа на оптичката густина на хуманите епителни клетки од трите групи (SG, SG+ZA, и SG+ZA+GGOH) согласно концентрациите на аплицираната золедронска киселина од 5 и 25 μM и геранилгераниол во концентрација од 50 μM .

4.1.5. Анализа на SG оптичка густина по 7 дена по групи при 5 μM ZA

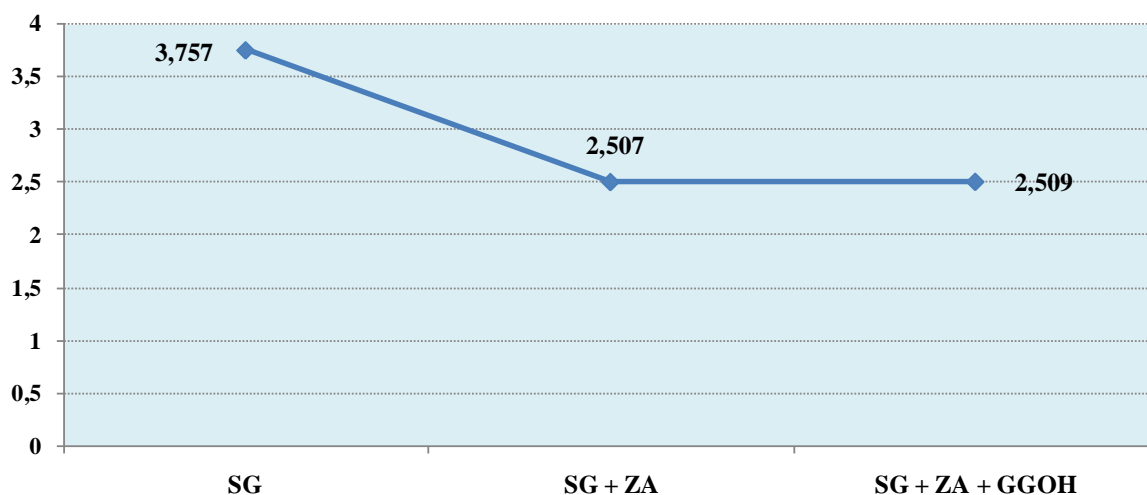
Согласно Табела 9, при 5 μM ZA, просечните вредности на SG оптичката густина по инкубација од 7 дена во трите групи (SG, SG+ZA, и SG+ZA+GGOH) изнесува консеквентно 3,757 v.s 2,507 v.s 2,509.

Табела 9. Анализа на SG оптичка густина по 7 дена по групи при 5 μM ZA

| Групи | ОПТИЧКА ГУСТИНА ПО 7 ДЕНА 5 μM ZA | | |
|------------|---|------------------------------------|------------------------------------|
| | Просек (means) | Темпо на опаѓање/растење (%) | Темпо на опаѓање/растење (%) |
| SG | 3,757 | Реф. | - |
| SG+ZA | 2,507 | ↓ 33,27% | Реф. |
| SG+ZA+GGOH | 2,509 | ↓ 33,22% | ↑ 0,08% |

Споредбената анализа укажа на темпо на намалување на оптичката густина во втората (SG+ZA) односно третата група (SG+ZA+GGOH) во однос на првата група (SG) за консеквентно 33,27% v.s 33,22%. Дополнителната анализа укажа дека присуството на геранилгераниолот во концентрација од 50 μM , по период на инкубација од 7 дена, резултирало со темпо на зголемување на оптичката густина во третата група (SG+ZA+GGOH) во однос на втората (SG+ZA) за само 0,08%. Графичкиот приказ на просечните вредности на SG оптичката густина при 5 μM ZA по инкубација од 7 дена во трите групи (SG, SG+ZA, и SG+ZA+GGOH) е даден на График 5 подолу во текстот.

График 5. Просечни вредности на SG оптичка густина по 7 дена по групи при 5 μ M ZA



4.1.6. Анализа на SG оптичка густина по 7 дена по групи при 25 μ M ZA

При 25 μ M ZA, просечните вредности на SG оптичката густина по инкубација од 7 дена во трите групи (SG, SG+ZA, и SG+ZA+GGOH) изнесува консеквентно 3,757 v.s 1,477 v.s 2,002 (Табела 10 и График 6).

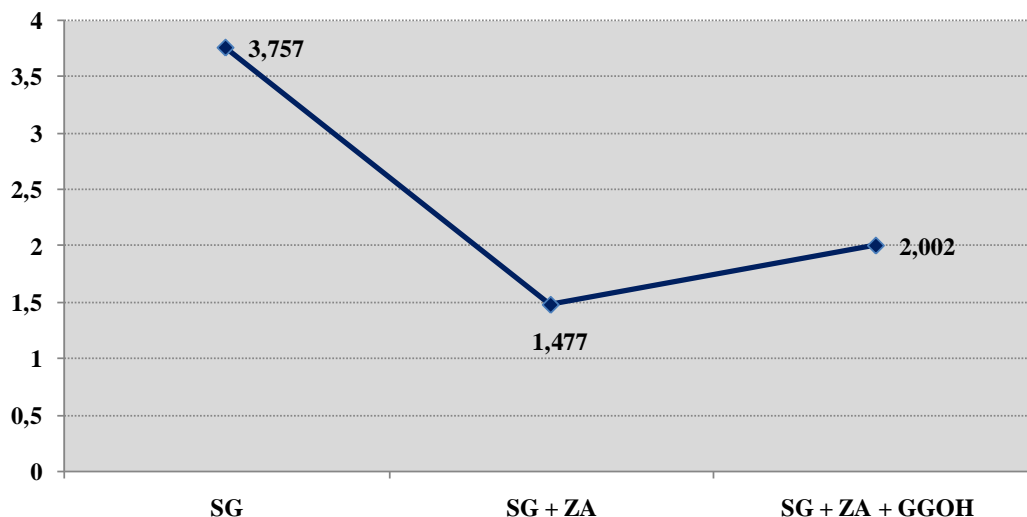
Табела 10. Анализа на SG оптичка густина по 7 дена по групи при 25 μ M ZA

| Групи | ОПТИЧКА ГУСТИНА ПО 7 ДЕНА 25 μ M ZA | | |
|------------|--|------------------------------|------------------------------|
| | Просек (means) | Темпо на опаѓање/растење (%) | Темпо на опаѓање/растење (%) |
| SG | 3,757 | Реф. | - |
| SG+ZA | 1,477 | ↓ 60,69% | Реф. |
| SG+ZA+GGOH | 2,002 | ↓ 46,71% | ↑ 35,54% |

Анализата укажа на темпо на намалување на оптичката густина во втората (SG+ZA) односно третата група (SG+ZA+GGOH) во однос на првата група (SG) за консеквентно 60,69% v.s 46,71%. Дополнителната анализа укажа на поголема оптичката густина во третата група (SG+ZA+GGOH) во однос на втората (SG+ZA) за

35,54% што се должи на присуството на геранилгераниолот во концентрација од 50 μM .

График 6. Просечни вредности на SG оптичка густина по 7 дена по групи при 50 μM ZA



4.1.7. Споредба на темпото на намалување на SG оптичка густина по 3 и 7 дена

По инкубација од 3 и 7 дена, направена е споредба на темпото на намалување на просечната SG оптичка густина при третирање со золедронска киселина во концентрации од 5 и 25 μM и геранилгераниолот во концентрација од 50 μM (Табела 11).

Табела 11. Темпо на намалување на SG оптичка густина по 3 и 7 дена

| Групи | ОПТИЧКА ГУСТИНА ПО 3 ДЕНА - темпо на намалување (%) - | | ОПТИЧКА ГУСТИНА ПО 7 ДЕНА - темпо на намалување (%) - | |
|------------|--|---------------------|--|---------------------|
| | 5 μM ZA | 25 μM ZA | 5 μM ZA | 25 μM ZA |
| SG | Реф. | Реф. | Реф. | Реф. |
| SG+ZA | ↓ 21,69% | ↓ 36,15% | ↓ 33,27% | ↓ 60,69% |
| SG+ZA+GGOH | ↓ 7,68% | ↓ 26,72% | ↓ 33,22% | ↓ 46,71% |

При третирање со 5 μM ZA, темпото на намалување на SG оптичката густина на ниво на групата SG+ZA во однос на групата SG, по инкубација од 3 и 7 дена, изнесува консеквентно 21,69% v.s 33,27%. Присуството на 50 μM GGOH резултира со

впечатливо помало темпо на намалување на SG оптичката густина на ниво на групата SG+ZA+GGOH во однос на групата SG по инкубација од 3 дена споредено со групата по инкубација од 7 дена за консеквентно 7,68% v.s 33,22%.

При третирање со 25 μ M ZA, темпото на намалување на SG оптичката густина на ниво на групата SG+ZA во однос на групата SG, по инкубација од 3 и 7 дена, изнесува консеквентно 36,15% v.s 60,69%. Присуството на 50 μ M GGOH резултира со впечатливо помало темпо на намалување на SG оптичката густина на ниво на групата SG+ZA+GGOH во однос на групата SG по инкубација од 3 дена споредено со групата по инкубација од 7 дена за консеквентно 26,72% v.s 46,71%.

4.2. Гингивални фибробласти (GN-23)

За исполнување на целите на истражувањето, направена е анализа на оптичката густина на гингивалните фибробласти од трите групи (SG, SG+ZA, и SG+ZA+GGOH) согласно концентрациите од 5, 25 и 50 μ M на аплицираната золедронска киселина и геранилгераниол во концентрација од 50 μ M. Анализата е правена по период на инкубација од 3 односно 7 дена.

Анализа по инкубација од 3 дена

4.2.1. Анализа на GN-23 оптичка густина по 3 дена по групи при 5 μ M ZA

Согласно Табела 12, при 5 μ M ZA, просечните вредности на GN-23 оптичката густина по инкубација од 3 дена во трите групи (GN-23, GN-23+ZA, и GN-23+ZA+GGOH) инесува консеквентно 0,888 v.s 0,554 v.s 0,596.

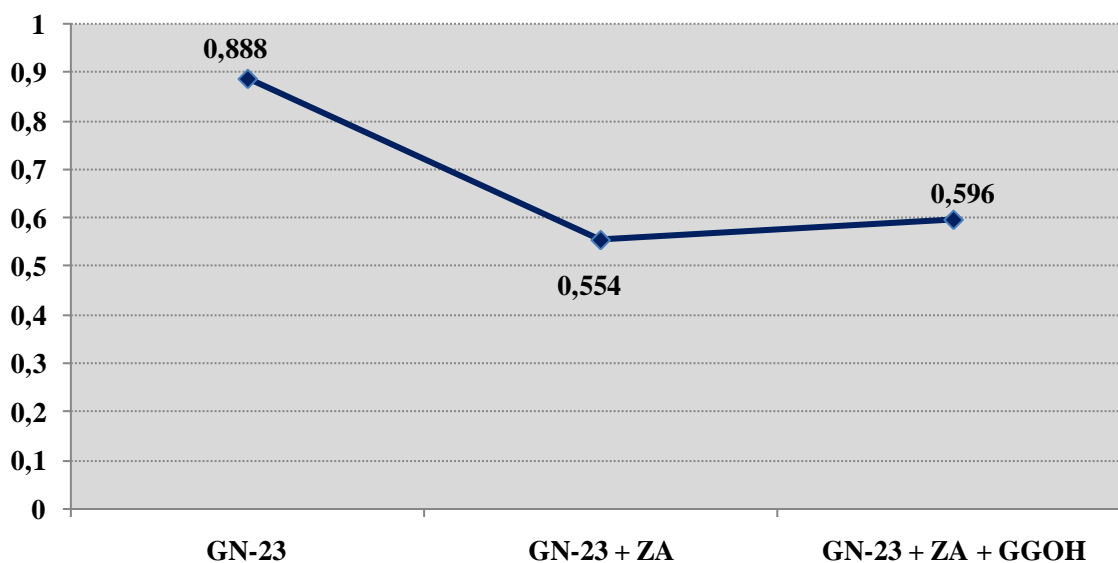
Споредбената анализа укажа на темпо на намалување на оптичката густина во втората (GN-23+ZA) односно третата група (GN-23+ZA+GGOH) во однос на првата група (GN-23) за консеквентно 37,61% v.s 32,88%. Дополнителната анализа укажа дека присуството на геранилгераниолот во концентрација од 50 μ M, по период на инкубација од 3 дена, резултирало со темпото на зголемување на оптичката густина во третата група (GN-23+ZA+GGOH) во однос на втората (GN-23+ZA) за 7,01%.

Графичкиот приказ на просечните вредности на GN-23 оптичката густина при 5 μM ZA по инкубација од 3 дена во трите групи (GN-23, GN-23+ZA, и GN-23+ZA+GGOH) е даден на График 7 подолу во текстот.

Табела 12. Анализа на GN-23 оптичка густина по 3 дена по групи при 5 μM ZA

| Групи | ОПТИЧКА ГУСТИНА ПО 3 ДЕНА 5 μM ZA | | |
|---------------|---|------------------------------------|------------------------------------|
| | Просек (means) | Темпо на опаѓање/растење (%) | Темпо на опаѓање/растење (%) |
| GN-23 | 0,888 | Реф. | - |
| GN-23+ZA | 0,554 | ↓ 37,61% | Реф. |
| GN-23+ZA+GGOH | 0,596 | ↓ 32,88% | ↑ 7,01% |

График 7. Просечни вредности на GN-23 оптичка густина по 3 дена по групи при 5 μM ZA



4.2.2. Анализа на GN-23 оптичка густина по 3 дена по групи при 25 μM ZA

Согласно Табела 13, при концентрација од 25 μM ZA, просечните вредности на GN-23 оптичката густина по инкубација од 3 дена во трите групи (GN-23, GN-23+ZA, и GN-23+ZA+GGOH) инесува консеквентно 2,448 v.s 1,563 v.s 1,794.

Направената анализа укажа на намалување на темпото на GN-23 оптичката густина во втората (GN-23+ZA) односно третата група (GN-23+ZA+GGOH) во однос на првата група (GN-23) за консеквентно 17,45% v.s 13,18% (Табела 13).

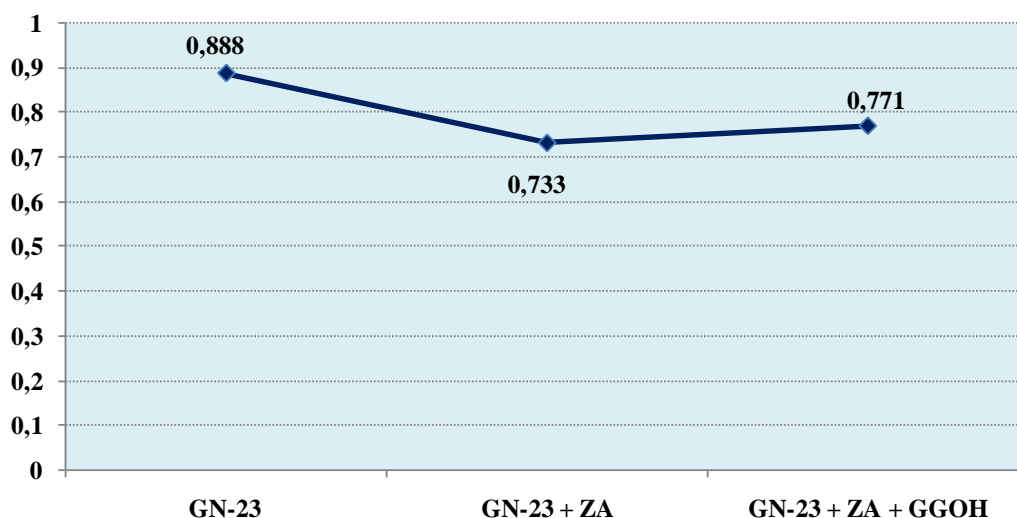
Дополнителната анализа укажа дека геранилгераниолот во концентрација од 50 μM , по период на инкубација од 3 дена, делувал на темпо на зголемување на оптичката густина во третата група (GN-23+ZA+GGOH) во однос на втората (GN-23+ZA) за 5,18% (Табела 13).

Табела 13. Анализа на GN-23 оптичка густина по 3 дена по групи при 25 μM ZA

| Групи | ОПТИЧКА ГУСТИНА ПО 3 ДЕНА 25 μM ZA | | |
|---------------|--|------------------------------------|------------------------------------|
| | Просек (means) | Темпо на опаѓање/растење (%) | Темпо на опаѓање/растење (%) |
| GN-23 | 0,888 | Реф. | - |
| GN-23+ZA | 0,733 | ↓ 17,45% | Реф. |
| GN-23+ZA+GGOH | 0,771 | ↓ 13,18% | ↑ 5,18% |

Графичкиот приказ на просечните вредности на GN-23 оптичката густина при 25 μM ZA по инкубација од 3 дена во трите групи (GN-23, GN-23+ZA, и GN-23+ZA+GGOH) е даден на График 8 подолу во текстот.

График 8. Просечни вредности на GN-23 оптичка густина по 3 дена по групи при 25 μM ZA



4.2.3. Анализа на GN-23 оптичка густина по 3 дена по групи при 50 μM ZA

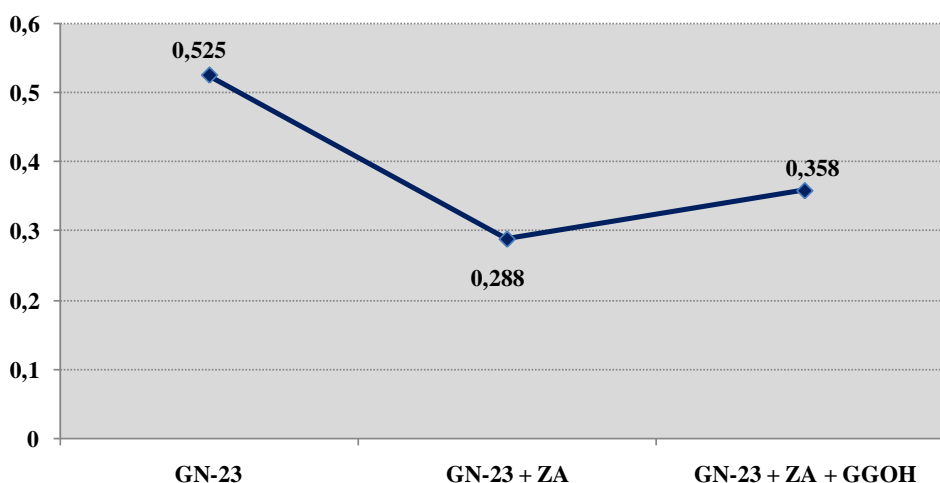
При 50 μM ZA, просечните вредности на GN-23 оптичката густина по инкубација од 3 дена во трите групи (GN-23, GN-23+ZA, и GN-23+ZA+GGOH) изнесува консеквентно 1,525 v.s 0,451 v.s 0,683 (Табела 14 и График 9). Анализата укажа на темпо на намалување на оптичката густина во втората (GN-23 +ZA) односно третата група (GN-23 +ZA+GGOH) во однос на првата група (GN-23) за консеквентно 45,14% v.s 31,81%.

Табела 14. Анализа на GN-23 оптичка густина по 3 дена по групи при 50 μM ZA

| Групи | ОПТИЧКА ГУСТИНА ПО 3 ДЕНА 50 μM ZA | | |
|---------------|--|------------------------------------|------------------------------------|
| | Просек (means) | Темпо на опаѓање/растење (%) | Темпо на опаѓање/растење (%) |
| GN-23 | 0,525 | Реф. | - |
| GN-23+ZA | 0,288 | ↓ 45,14% | Реф. |
| GN-23+ZA+GGOH | 0,358 | ↓ 31,81% | ↑ 24,31% |

Дополнителната анализа укажа на поголема просечна оптичката густина во третата група (GN-23 +ZA+GGOH) во однос на втората (GN-23 +ZA) за 24,31% што се должи на присуството на геранилгераниолот во концентрација од 50 μM .

График 9. Просечни вредности на GN-23 оптичка густина по 3 дена по групи при 50 μM ZA



4.2.4. Споредба на темпото на намалување на GN-23 оптичка густина по 3 дена при различни концентрации на ZA

По инкубација од 3 дена, направена е анализа во однос на темпото на намалување на оптичката густина на гингивалните фибробласти по третирање со золедронска киселина во концентрации од 5, 25 и 50 μM и геранилгераниолот во концентрација од 50 μM (Табела 15).

Табела 15. Темпо на намалување на GN-23 оптичка густина по 3 ден

| Групи | ОПТИЧКА ГУСТИНА ПО 3 ДЕНА - темпо на намалување (%) - | | |
|---------------|--|---------------------|---------------------|
| | 5 μM ZA | 25 μM ZA | 50 μM ZA |
| GN-23 | Реф. | Реф. | Реф. |
| GN-23+ZA | ↓ 37,61% | ↓ 17,45% | ↓ 45,14% |
| GN-23+ZA+GGOH | ↓ 32,88% | ↓ 13,18% | ↓ 31,81% |

При аплицирање на 5, 25 и 50 μM концентрации на золедронската киселина, на ниво на групата GN-23+ZA во однос на групата GN-23, утврдено е темпо на намалување на оптичката густина за консеквентно 37,61% v.s 17,45% v.s 45,14%. Не е согледана поврзаност помеѓу зголемувањето на концентрацијата на ZA и намалувањето на GN-23 оптичката густина.

Анализата укажа дека, геранилгераниолот во концентрација од 50 μM , делува на впечатливо помало темпо на намалување на GN-23 оптичката густина на ниво на групата GN-23 +ZA+GGOH во однос на групата GN-23 за консеквентно 32,88% v.s 13,18% v.s 31,81% што претставува за 1,14 v.s 1,32 v.s 1,41 пати поголема просечна GN-23 оптичка густина споредено со групата GN-23+ZA (Табела 15).

Анализа по инкубација од 7 дена

Во рамките на истражувањето, по инкубација од 7 дена, направена е анализа на оптичката густина на гингивалните фибробласти од трите групи (GN-23, GN-23 +ZA и

GN-23 +ZA+GGOH) согласно концентрациите на аплицираната золедронска киселина од 5 и 25 μM и геранилгераниол во концентрација од 50 μM .

4.2.5. Анализа на GN-23 оптичка густина по 7 дена по групи при 5 μM ZA

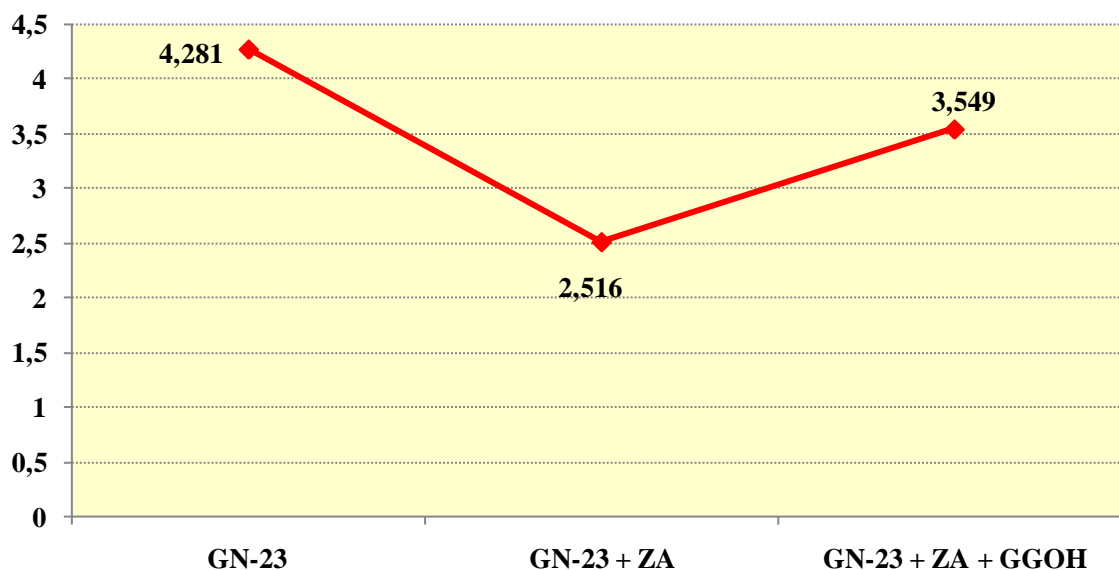
Согласно Табела 16, при 5 μM ZA, просечните вредности на GN-23 оптичката густина по инкубација од 7 дена во трите групи (GN-23, GN-23 +ZA, и GN-23 +ZA+GGOH) изнесува консеквентно 4,281 v.s 2,516 v.s 3,549.

Табела 16. Анализа на GN-23 оптичка густина по 7 дена по групи при 5 μM ZA

| Групи | ОПТИЧКА ГУСТИНА ПО 7 ДЕНА 5 μM ZA | | |
|---------------|---|------------------------------------|------------------------------------|
| | Просек (means) | Темпо на опаѓање/растење (%) | Темпо на опаѓање/растење (%) |
| GN-23 | 4,281 | Реф. | - |
| GN-23+ZA | 2,516 | ↓ 41,23% | Реф. |
| GN-23+ZA+GGOH | 3,549 | ↓ 17,09% | ↑ 41,05% |

Споредбената анализа укажа на темпо на намалување на оптичката густина во втората (GN-23+ZA) односно третата група (GN-23+ZA+GGOH) во однос на првата група (GN-23) за консеквентно 41,23% v.s 17,09%. Дополнителната анализа укажа дека присуството на геранилгераниолот во концентрација од 50 μM , по период на инкубација од 7 дена, резултирало со темпо на зголемување на оптичката густина во третата група (GN-23+ZA+GGOH) во однос на втората (GN-23+ZA) 41,05%. Графичкиот приказ на просечните вредности на SG оптичката густина при 5 μM ZA по инкубација од 7 дена во трите групи (GN-23, GN-23 +ZA, и GN-23 +ZA+GGOH) е даден на График 10 подолу во текстот.

График 10. Просечни вредности на GN-23 оптичка густина по 7 дена по групи при 5 μ M ZA



4.2.6. Анализа на GN-23 оптичка густина по 7 дена по групи при 25 μ M ZA

При 25 μ M ZA, просечните вредности на SG оптичката густина по инкубација од 7 дена во трите групи (GN-23, GN-23 +ZA и GN-23 +ZA+GGOH) изнесува консеквентно 4,281 v.s 3,703 v.s 4,019 (Табела 17 и График 11).

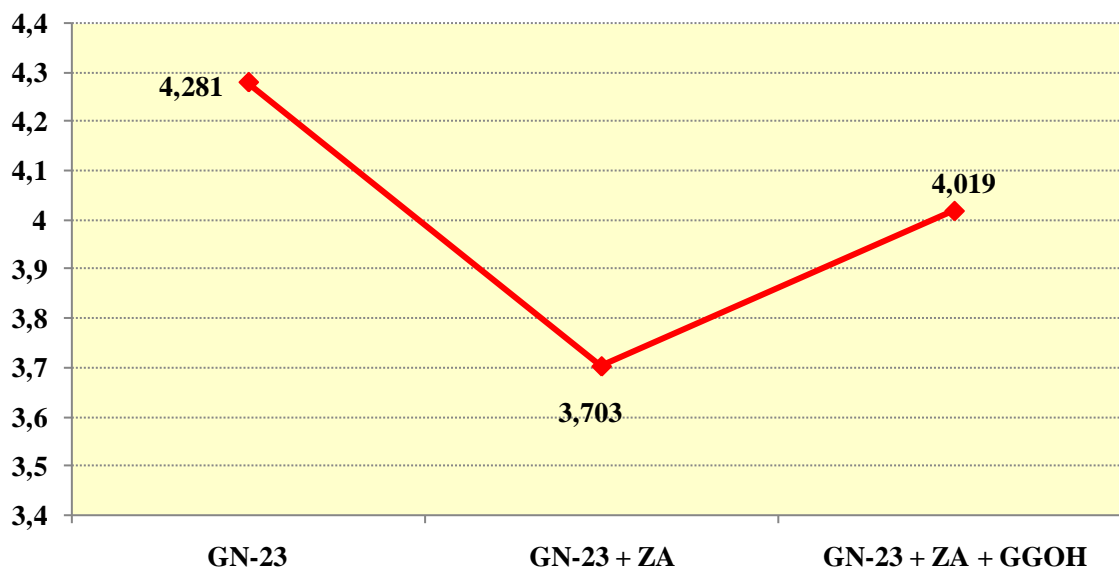
Табела 17. Анализа на GN-23 оптичка густина по 7 дена по групи при 25 μ M ZA

| Групи | ОПТИЧКА ГУСТИНА ПО 7 ДЕНА 25 μ M ZA | | |
|---------------|--|------------------------------|------------------------------|
| | Просек (means) | Темпо на опаѓање/растење (%) | Темпо на опаѓање/растење (%) |
| GN-23 | 4,281 | Реф. | - |
| GN-23+ZA | 3,703 | ↓ 13,50% | Реф. |
| GN-23+ZA+GGOH | 4,019 | ↓ 6,12% | ↑ 8,53% |

Анализата укажа на темпо на намалување на оптичката густина во втората (GN-23+ZA) односно третата група (GN-23+ZA+GGOH) во однос на првата група (GN-23) за консеквентно 13,50% v.s 6,12%. Дополнителната анализа укажа на поголема оптичката густина во третата група (GN-23+ZA+GGOH) во однос на втората (GN-

23+ZA) за 8,50% што се должи на присуството на геранилгераниолот во концентрација од 50 μM .

График 11. Просечни вредности на GN-23 оптичка густина по 7 дена по групи при 50 μM ZA



4.2.7. Споредба на темпото на намалување на GN-23 оптичка густина по 3 и 7 дена при различни концентрации на ZA

По инкубација од 3 и 7 дена, направена е споредба на темпото на намалување на просечната GN-23 оптичка густина при третирање со золедронска киселина во концентрации од 5 и 25 μM и геранилгераниолот во концентрација од 50 μM (Табела 18).

Табела 18. Темпо на намалување на GN-23 оптичка густина по 3 и 7 дена

| Групи | ОПТИЧКА ГУСТИНА ПО 3 ДЕНА - темпо на намалување (%) - | | ОПТИЧКА ГУСТИНА ПО 7 ДЕНА - темпо на намалување (%) - | |
|----------------------|--|---------------------|--|---------------------|
| | 5 μM ZA | 25 μM ZA | 5 μM ZA | 25 μM ZA |
| GN-23 | Реф. | Реф. | Реф. | Реф. |
| GN-23+ZA | ↓ 37,61% | ↓ 17,45% | ↓ 41,23% | ↓ 13,50% |
| GN-23+ZA+GGOH | ↓ 32,88% | ↓ 13,18% | ↓ 17,09% | ↓ 6,12% |

При третирање со 5 μ M ZA, темпото на намалување на GN-23 оптичката густина на ниво на групата GN-23+ZA во однос на групата GN-23, по инкубација од 3 и 7 дена, изнесува консеквентно 37,61% v.s 41,23%. Присуството на 50 μ M GGOH резултира со впечатливо поголемо темпо на намалување на GN-23 оптичката густина на ниво на групата SG+ZA+GGOH во однос на групата SG по инкубација од 3 дена споредено со групата по инкубација од 7 дена за консеквентно 32,88% v.s 17,09%.

При третирање со 25 μ M ZA, темпото на намалување на SG оптичката густина на ниво на групата SG+ZA во однос на групата SG, по инкубација од 3 и 7 дена, изнесува консеквентно 17,45% v.s 13,50%. Присуството на 50 μ M GGOH резултира со впечатливо поголемо темпо на намалување на GN-23 оптичката густина на ниво на групата GN-23+ZA+GGOH во однос на групата GN-23 после инкубација од 3 дена споредено со групата по инкубација од 7 дена за консеквентно 13,18% v.s 6,12%.

4.3. Споредба на темпото на намалување на SG и GN-23 оптичката густина по 3 и по 7 дена при различни концентрации на ZA

За исполнување на целите на истражувањето, направена е анализа на споредба на SG и GN-23 оптичката густина после инкубација од 3 и 7 дена (Табела 19 и Табела 20).

Табела 19. Темпо на намалување на SG и GN-23 оптичка густина по 3 дена

| Групи | ОПТИЧКА ГУСТИНА ПО 3 ДЕНА - темпо на намалување (%) - | | |
|---------------|--|---------------|---------------|
| | 5 μ M ZA | 25 μ M ZA | 50 μ M ZA |
| SG | Реф. | Реф. | Реф. |
| SG+ZA | ↓ 21,69% | ↓ 36,15% | ↓ 79,43% |
| SG+ZA+GGOH | ↓ 7,68% | ↓ 26,72% | ↓ 55,21% |
| GN-23 | Реф. | Реф. | Реф. |
| GN-23+ZA | ↓ 37,61% | ↓ 17,45% | ↓ 45,14% |
| GN-23+ZA+GGOH | ↓ 32,88% | ↓ 13,18% | ↓ 31,81% |

Анализата укажа дека, по инкубација од 3 дена, темпото на намалување на SG оптичката густина расте со растење на концентрацијата на ZA. Ова не е случај со GN-23 оптичката густина чие темпо на намалување е најмалото при концентрација на ZA 25 μ M а најголемото при ZA 50 μ M. Согледано е дека, по инкубација од 3 дена, присуството на геранилгераниолот во концентрација од 50 μ M делува на впечатливо помало темпо на намалување како на SG така и на GN-23 оптичката густина при сите испитувани концентрации на ZA (Табела 19).

По инкубација од 7 дена, анализата укажа дека при растењето на концентрацијата на ZA, темпото на опаѓање на SG оптичката густина расте, а темпото на опаѓање на GN-23 оптичката густина се намалува (Табела 20). Согледано е дека геранилгераниолот во концентрација од 50 μ M делува на впечатливо помало темпо на намалување како на SG така и на GN-23 оптичката густина при сите испитувани концентрации на ZA (Табела 20).

Табела 20. Темпо на намалување на SG и GN-23 оптичка густина по 7 дена

| Групи | ОПТИЧКА ГУСТИНА ПО 7 ДЕНА - темпо на намалување (%) - | |
|---------------|--|---------------|
| | 5 μ M ZA | 25 μ M ZA |
| SG | Реф. | Реф. |
| SG+ZA | ↓ 33,27% | ↓ 60,69% |
| SG+ZA+GGOH | ↓ 33,22% | ↓ 46,71% |
| GN-23 | Реф. | Реф. |
| GN-23+ZA | ↓ 41,23% | ↓ 13,50% |
| GN-23+ZA+GGOH | ↓ 17,09% | ↓ 6,12% |

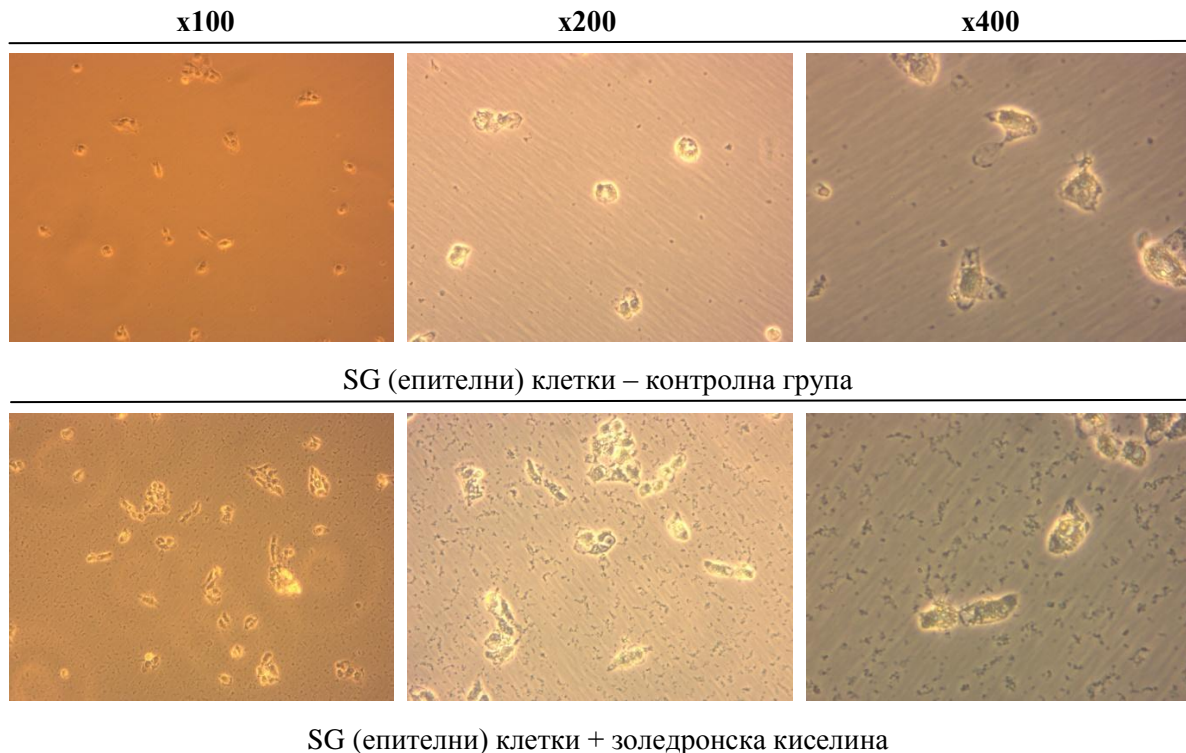
4.4. Микроскопска анализа на морфолошка структура

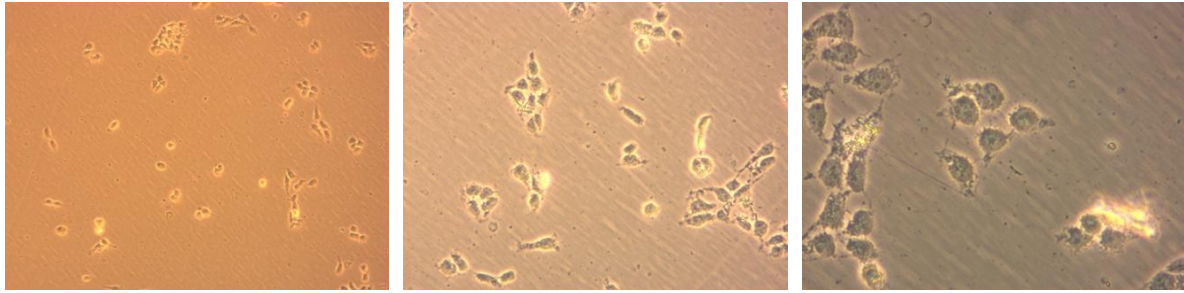
Анализата на морфолошката структура на клетките е направена со цел да се согледа дали постои совпаѓање со наодите добиени со МТТ тестот. Забележано е дека групите на клетки од двете линии (епителни клетки и гингивални фибробласти)

третирани само со золедронска киселина претрпеле значајни структурни промени во споредба со групите кои не се третирани со золедронска киселина. Овие промени се однесуваат на зголемување на јадрата на клетките, дезинтеграција на клеточната мембрана и цитоплазмата, како и откачување на клетките од подлогата и распрснување на разградните продукти од органелите низ целата подлога.

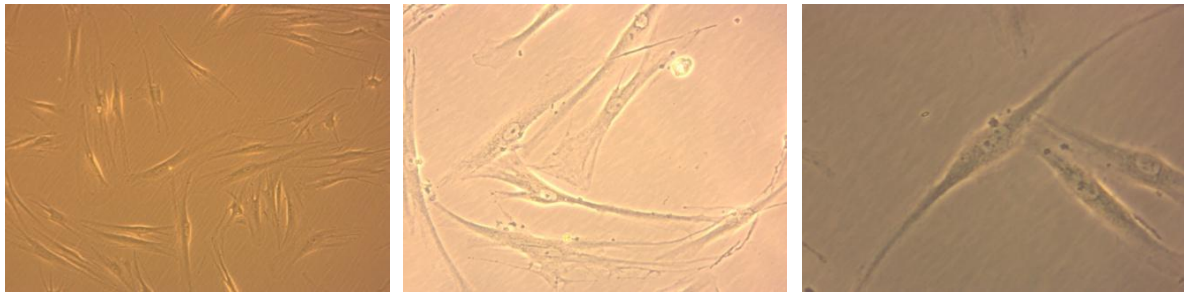
Во групите пак третирани со золедронска киселина и геранилгераниол, може да се забележи подобра морфолошка структура во споредба со групите третирани само со золедронска киселина. Забележително беше помалото количество на распаднати продукти на подлогата, помалку откачени клетки и делумно враќање на соодветната форма на клетките. Сепак, и овие групи клетки се разликуваа од контролната, т.е. од групата која не беше третирана со никаков медикамент, што го објаснува делумното оштетување на клетките, т.е. делумното враќање на виталноста и метаболизмот докажани со МТТ тестот.

Ова укажува дека морфолошката анализа се совпаѓа со наодите добиени со тестот за виталноста на клетките. Фотографиите од секоја група клетки на три различни зголемувања (x100, x200 и x400) се прикажани на слика 15.

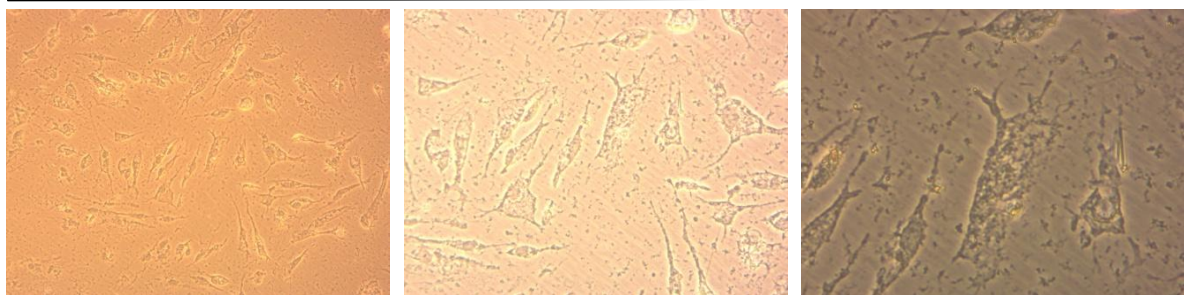




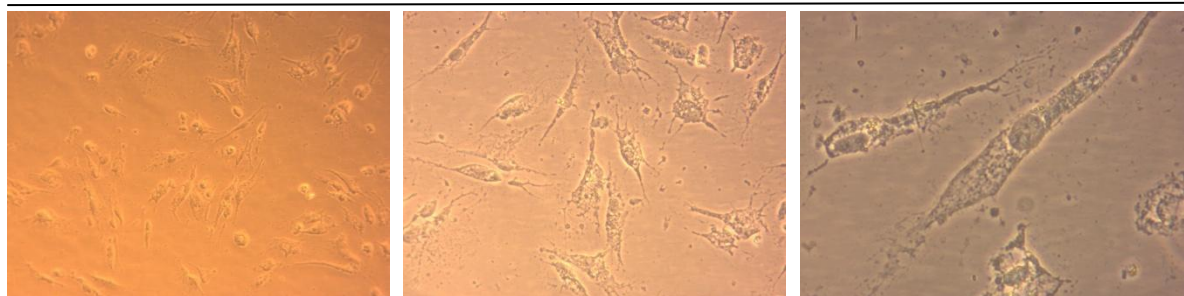
SG (епителни) клетки + золедронска киселина + геранилгераниол



GN-23 клетки (гингивални фибробласти) – контролна група



GN-23 клетки (гингивални фибробласти) + золедронска киселина



GN-23 клетки (гингивални фибробласти) + золедронска киселина + геранилгераниол

Сл. 15. Приказ на фотографиите направени при микроскопска анализа на морфолошката структура на клетките со различни зголемувања.

4.5. Дискусија

Ефектите на бисфосфонатите на различни клеточни линии до сега се доста истражувани. Како и да е, само неколку студии ги прават овие анализи со иста доза на бисфосфонат и исто време на инкубација.^{78,114,115} Нашето истражување го евалуира

ефектот на золедронската киселина во три различни концентрации, врз хуманите епителни клетки и гингивални фибробласти, во две различни времиња на инкубација. Овие популации на клетки играат голема улога во одржувањето на хомеостазата на оралната мукоза и заздравувањето на ткивата.¹¹⁶ Дополнително, интеракцијата меѓу епителните клетки и фибробластите е директно поврзана со постекстракционото зараснување на раните.

Генерално, се покажа дека золедронската киселина ја намалува виталноста и метаболната активност на клетките, и тоа во зависност од нејзината концентрација. Претходните студии исто така ја покажале осетливоста на овие клетки на овој тип бисфосфонат, кој е најпотентниот претставник на групата бисфосфонати кои содржат азот во составот. Basso и сор. демонстрирале намалување на виталноста на клетките преку МТТ тестот за 67% споредено со референтната вредност кај епителните клетки, и за 40% кај гингивалните фибробласти по период на инкубација од 48 часа и ниски концентрации на золедронска киселина.⁷⁹ Намалување на виталноста на хуманите орални фибробласти и епителни клетки по инкубација со ниски концентрации на золедронска киселина, слично на најниската концентрација користена во нашата студија е покажано и во истражувањето на Schepers и сор. кои добиле процент на намалување на виталноста од околу 30%, што е во согласност со нашето истражување.⁷⁸ Ravosa и сор. нашле поголема осетливост на епителните клетки на цитотоксичноста на золедронската киселина по инкубација со дози на золедронска киселина над 30 μM , што е во согласност со добиените резултати во нашата студија.⁷⁶ Како и да е, во нивната студија не било покажано поголемо намалување на виталноста при пониски дози на золедронска киселина, што беше случај со претходно споменатите студии. Разликите во резултатите меѓу тие студии може да се должат на различните концентрации, времето на контакт и типот на клеточните линии.

Walter и сор. добиле намалување на виталноста на гингивалните фибробласти инкубирани со 5 μM золедронска киселина за 80% по 24 часа, односно за 40% по 48 часа.¹¹⁴ Вакви разлики се добиени и во нашето истражување на виталноста на гингивалните фибробласти, т.е. постои одреден пад на темпото на намалување на оптичката густина, т.е. виталноста на клетките при третирање на клетките со иста концентрација во две различни точки на мерења (по 3 и по 7 дена). Ваквите резултати кои се во согласност со спомнатата студија сугерираат дека цитотоксичноста на золедронската киселина не е временски зависна кога станува збор за гингивалните фибробласти. Сепак, временска зависност во намалувањето на виталноста е најдена во

истражувањето на Cozin и сор., кои покажале зголемување на токсичното дејство на золедронската киселина во ниски дози со зголемување на времетраењето на инкубација (по 3, односно 7 дена).⁸⁸

Значајно намалување на виталноста на фибробластите е најдено и во студијата на Ziebart и сор., кој употребувал концентрации од 5 и 50 μM , што е целосно во согласност со нашата студија.⁹⁰ При концентрации од 5, 10 и 20 μM золедронска киселина Acil и сор. покажале силно намалување на виталноста на фибробластите по инкубација од 7 дена, и тоа до 95%, за разлика од концентрацијата од 1 μM каде намалувањето е до 60%.⁷⁷ Ravosa и сор. третирале епителни клетки и фибробласти во концентрации од 1-100 μM и покажале намалување на виталноста на двете линии клетки, започнувајќи од концентрација од 10 μM па нагоре, со тоа што со зголемувањето на концентрацијата било забележано намалување на виталноста, т.е. поголемо темпо на намалување на виталноста.⁷⁶ Во ова истражување се заклучило дека на исти концентрации на золедронска киселина, фибробластите биле поосетливи за разлика од епителните клетки. Овие резултати се во согласност со нашите добиени резултати, но само за концентрацијата од 5 μM золедронска киселина, каде и по 3 и по 7 дена инкубација се покажа дека гингивалните фибробласти се поосетливи на бисфосфонатот, т.е. кај нив има поизразено темпо на намалување на виталноста во споредба со епителните клетки. Сепак, повисоките дози на золедронска киселина, независно од должината на инкубација, во нашето истражување покажаа поголема токсичност на епителните клетки, во споредба со гингивалните фибробласти. Ваквите разлики најверојатно се должат на различните линии на клетки користени во спомнатите студии. Кога станува збор за временската зависност на намалувањето на виталноста на епителните клетки, резултатите во нашето истражување се во согласност со резултатите од спомнатото истражување кои покажуваат намалување на виталноста, т.е. поголемо темпо на намалување на виталноста со зголемување и на концентрацијата, но и на времето на инкубација. Концентрацијата од 50 μM покажала значајно намалување на виталноста на гингивалните фибробласти и во истражувањето на Draenert и сор., што е во согласност со нашите резултати.⁸⁷

Геранилгераниолот е природна молекула која може да се изолира од различни растенија или да се синтетизира биохемиски. Тој е метаболит на мевалонскиот пат кај луѓето и претставува изопреноиден липиден супстрат кој се конвертира во геранилгеранил пирофосфат (GGPP)¹¹⁷, меѓупродукт во мевалонскиот пат, кој се добива под дејство на фарнезил пирофосфат синтетаза (FPP), ензимот кој всушност е

инхибиран од бисфосфонатите кои содржат азот. GGON може да се спротивстави на ефектот на овие бисфосфонати врз остеокластната формација, апоптозата и коскената ресорпција.¹¹⁸ Овие ефекти на геранилгераниолот се демонстрирани во ин витро услови на различни клеточни линии. Во нашето истражување геранилгераниолот беше додаван на хумани епителни клетки и гингивални фибробласти кои претходно беа третирани со золедронска киселина, а потоа беше вршено мерење на виталноста и метаболната активност на клетките и споредба со контролната група и групата третирана само со золедронска киселина. Резултатите добиени во нашето истражување одат во прилог на подобрување на функцијата преку зголемување на виталноста по додавање на геранилгераниол во концентрација од 50 μ M. Од резултатите јасно може да се види дека темпото на пад на виталноста кај сите клетки третирани со золедронска киселина и геранилгераниол е помало во споредба со темпото на пад кај клетките третирани само со золедронска киселина. Ова се должи на способноста на геранилгераниолот повторно да се вклучи во мевалонскиот пат и да овозможи пренилизација на малите протеини (GTP-ази) неопходни за нормално функционирање на клетките, т.е. нормален животен циклус, способност за навремена и брза репродукција, миграција и соодветен одговор на ткивното оштетување.

Сепак, во ниту една од групите не е забележано целосно враќање на функцијата на клетките, бидејќи золедронската киселина истовремено извршила инхибиција на ензимите потребни за нормално извршување на метаболизмот во клетките. Намалувањето на виталноста на клетките третирани со золедронска киселина и геранилгераниол кај епителните клетки е помало кај пониските концентрации на золедронска киселина, особено по три дена инкубација, што укажува на поголемо оштетување при поголеми концентрации, што е дискутирано погоре во текстот. Темпото на пораст на оптичката густина, следствено на тоа, е поголемо кај клетките кои претрпеле поголеми оштетувања, т.е. кај повисоките концентрации на золедронска киселина, и по три и по седум дена инкубација. Во однос на фибробластите, поради разликите во оштетувањата во зависност од концентрацијата и времето на инкубација, може да се заклучи дека по три дена инкубација најголемо темпо на пораст има кај највисоката концентрација на золедронска киселина, т.е. кај најголемата разлика на виталноста меѓу клетките третирани само со золедронска киселина и клетките третирани со золедронска киселина и геранилгераниол, а по седум дена тоа е кај најниската концентрација, бидејќи оваа разлика е најизразена таму. По седумдневна инкубација, поголемо темпо на пораст има кај фибробластите на ниска концентрација,

а кај епителните клетки при висока концентрација на золедронска киселина. Кај тридневниот експеримент, најголемо темпо на раст и двете линии клетки имаат кај групите третирани со највисока концентрација на золедронска киселина.

Овие резултати се во согласност со резултатите добиени од страна на Ziebart и сор. кои покажале значајно подобрување на виталноста на фибробластите на кои им бил додаван геранилгераниол во концентрација од 10 μM , а кои претходно биле третирани со золедронска киселина во концентрација од 5 и 50 μM .⁹⁰ Геранилгераниолот реверзно делувал на токсичното дејство на золедронската киселина на оралните кератиноцити во истражувањето на Pabst.⁸⁹ Овие клетки се исто така репрезентативни за приказ на меките ткива, па оттука и овие резултати толкуваме дека одат во прилог на нашето истражување. Додавањето на геранилгераниол ја подобрил функцијата на испитуваните клетки за 75% во истражувањето на Cozin и сор., што исто така е во согласност со нашите резултати, иако постои мала разлика во степенот на изразеност на ова дејство.⁸⁸

Морфолошките анализи на епителните клетки и фибробластите по третман со различни концентрации на золедронска киселина покажаа значајни морфолошки оштетувања во двете клеточни линии третирани со бисфосфонатот. Овие клетки покажаа разградена цитоплазма и клеточна мембрана како и оштетени органели. Овие резултати се во согласност со наодите на Basso и сор., Schepfer и сор. и Draenert и сор.^{78,79,87} Делумното подобрување на функцијата на клетките по додавање на геранилгераниол тестирано со МТТ тестот се преслика и во морфолошките микроскопски анализи, на кои се гледа помал степен на структурни (цитоплазматски, нуклеарни и мембрански) оштетувања. Овие наоди се во согласност со оние на Cozin и сор. кои ги испитувале фокалните атхезии и актинскиот цитоскелет на оралните фибробласти третирани со золедронска киселина и геранилгераниол.⁸⁸ Флуоресцентната микроскопија покажала речиси целосно враќање на структурата на скелетот и помалку фокални атхезии, како и влакна со актински оштетувања. Слични наоди добиле и Ziebart и сор, што исто така е во согласност со нашите испитувања.⁹⁰

Анимален модел

Анималниот модел на студијата е извршен на вкупно 30 експериментални животни од типот бел лабораториски стаорец (Wistar), машки пол, со старост од 4 месеци и тежина од 150-300 грама. Стаорците се поделени во три групи од по 10 животни (една контролна и две испитувани групи).

4.6. Дескриптивна анализа по групи според тежина во шест времиња на мерење

Тежината на стаорците во секоја од трите групи (Испитувана група I, Испитувана група II и Контролна група) е мерена секоја недела и тоа на: 0, 7, 14, 21, 28 и 35 ден.

4.6.1. Анализа на дистрибуција на фреквенции на тежина на стаорци по групи

Анализата на дистрибуцијата на мерењата на тежината на стаорците од ИСПИТУВАНАТА ГРУПА – I, во сите шест временски точки (0, 7, 14, 21, 28 и 35 ден) укажа на присуство на нормална дистрибуција на добиените вредности за консеквентно Shapiro-Wilk $W=0,923$, $p=0,383$ v.s. Shapiro-Wilk $W=0,966$, $p=0,848$ v.s. Shapiro-Wilk $W=0,975$, $p=0,934$ v.s. Shapiro-Wilk $W=0,991$, $p=0,997$ v.s. Shapiro-Wilk $W=0,965$, $p=0,843$ v.s. Shapiro-Wilk $W=0,949$, $p=0,663$. Графичкиот приказ на дистрибуцијата на фреквенциите е даден на График 12 подолу во текстот. Согласно нормалната дистрибуција на фреквенциите во понатамошната анализа за оваа група се применети параметарски тестови.

Дистрибуцијата на мерењата на тежината на стаорците од ИСПИТУВАНАТА ГРУПА – II, во сите шест временски точки (0, 7, 14, 21, 28 и 35 ден) укажа на присуство на нормална дистрибуција на добиените вредности за консеквентно Shapiro-Wilk $W=0,756$ $p=0,004$ v.s. Shapiro-Wilk $W=0,947$ $p=0,638$ v.s. Shapiro-Wilk $W=0,949$, $p=0,661$ v.s. Shapiro-Wilk $W=0,962$, $p=0,812$ v.s. Shapiro-Wilk $W=0,851$, $p=0,077$ v.s. Shapiro-Wilk $W=0,896$, $p=0,231$.

График 12. Анализа на дистрибуција на фреквенции на тежина во ИСПИТУВАНА ГРУПА – I, во шест времиња на мерење

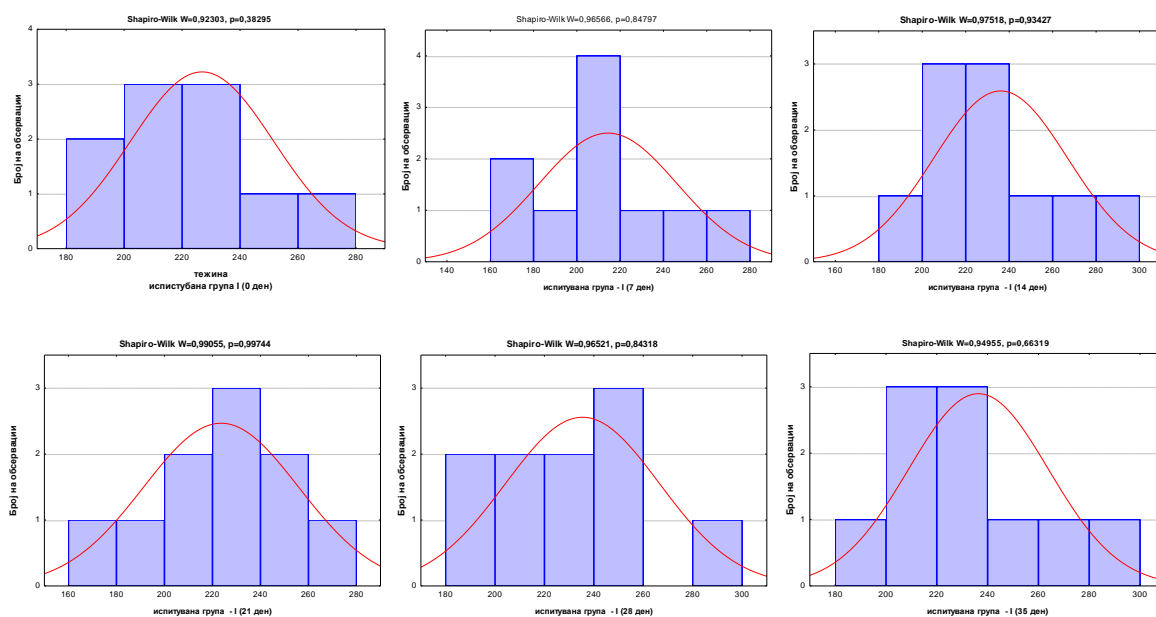
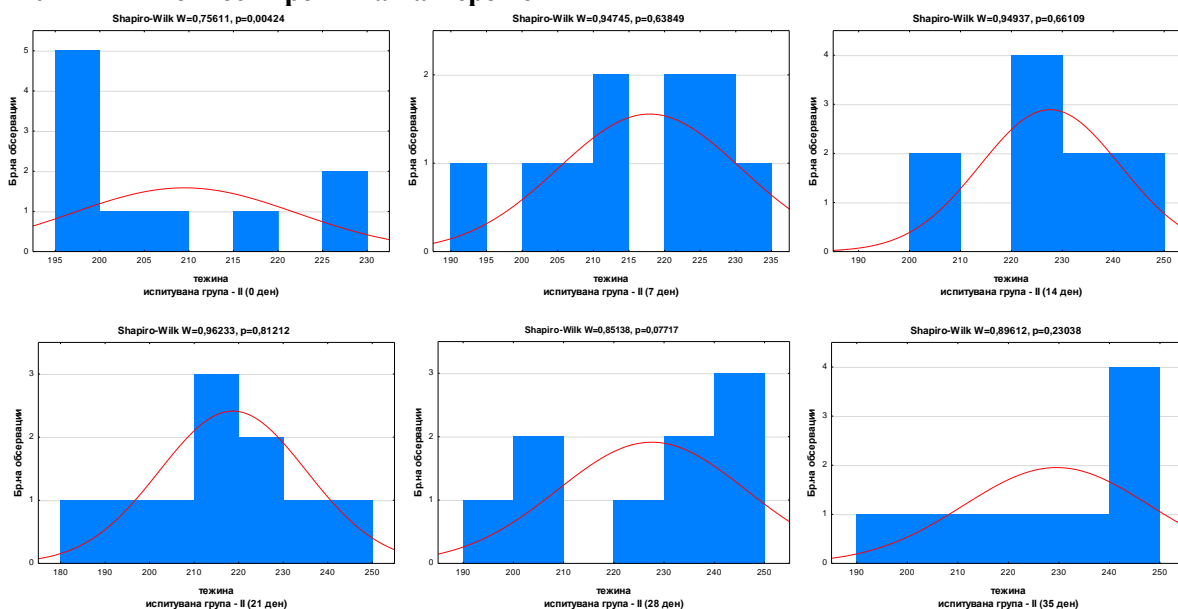


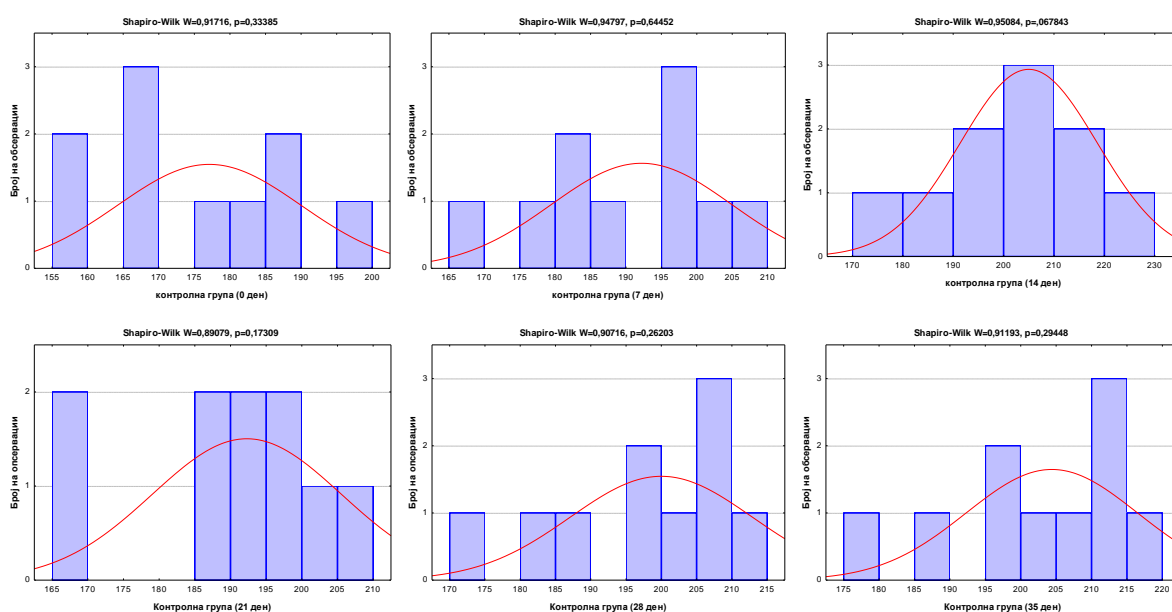
График 13. Анализа на дистрибуција на фреквенции на тежина во ИСПИТУВАНА ГРУПА – II во шест времиња на мерење



Во КОНТРОЛНАТА ГРУПА, анализата на дистрибуцијата на мерењата на тежината на стаорците во сите шест временски точки (0, 7, 14, 21, 28 и 35 ден) укажа на присуство на нормална дистрибуција на добиените вредности за консеквентно Shapiro-

Wilk $W=0,917$ $p=0,334$ v.s. Shapiro-Wilk $W=0,948$ $p=0,644$ v.s. Shapiro-Wilk $W=0,951$, $p=0,678$ v.s. Shapiro-Wilk $W=0,891$, $p=0,173$ v.s. Shapiro-Wilk $W=0,907$, $p=0,262$ v.s. Shapiro-Wilk $W=0,912$, $p=0,294$. Графичкиот приказ на дистрибуцијата на фреквенциите на тежината на стаорците во шест времиња на мерење во КОНТРОЛНАТА ГРУПА е даден на График 14. Согласно нормалната дистрибуција на фреквенциите, во понатамошната анализа, за оваа група се применети параметарски тестови.

График 14. Анализа на дистрибуција на фреквенции на тежина во КОНТРОЛНА ГРУПА во шест времиња на мерење



4.6.2. Дескриптивна анализа на тежината на стаорци по групи во шест времиња на мерење

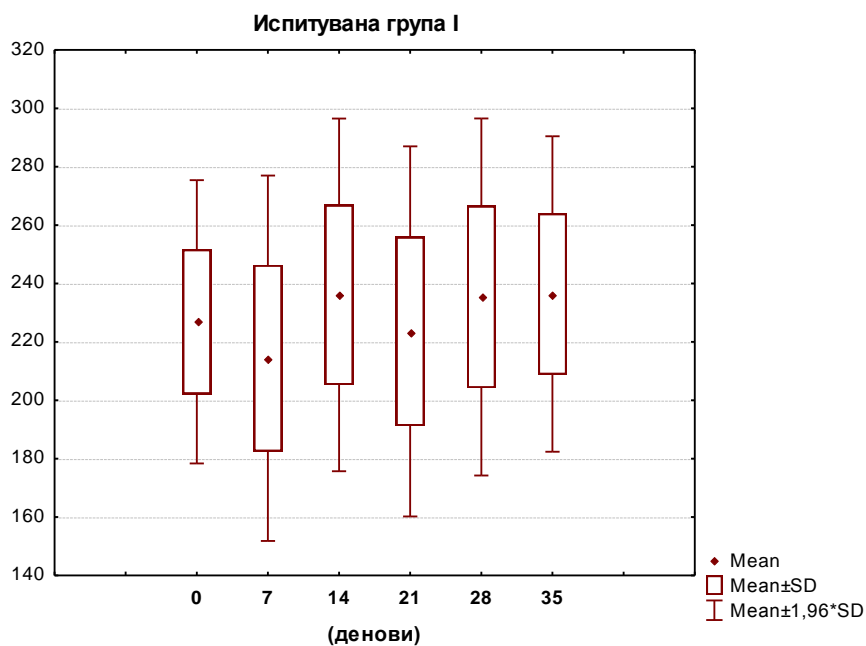
Во рамките на истражувањето, направена е дескриптивна анализа и на секоја од двете испитувани групи поединечно во однос на тежината на испитуваните стаорци. Во овие групи стаорците се третирани со интраперитонеална апликација на золедронска киселина (Zolenat[®], 4mg/5ml, Mustafa Nevzat Ilac Sanayii A.S., Istanbul, Turkey) во концентрација од 0,06 мг/кг и волумен од 0,5 мл. По извршената екстракција на првиот молар во долната вилица десно на 21 ден, на стаорците од втората испитувана група, секој ден локално на екстракционата рана им беше аплициран раствор од геранилгераниол (Sigma-Aldrich) во концентрација од 5 mM.

Табела 21. Дескриптивна анализа на тежината на стаорците по групи во шест времиња на мерење

| Време на мерење по групи | N | Mean | Std. Deviation | 95% CI for Mean | | Minimum | Maximum | |
|--------------------------|------|------|----------------|-----------------|-------------|---------|---------|-----|
| | | | | Lower Bound | Upper Bound | | | |
| 0 ДЕН | ИГ-1 | 10 | 226,9 | 24,7 | 209,2 | 244,6 | 195 | 280 |
| | ИГ-2 | 10 | 209,5 | 12,6 | 200,5 | 218,5 | 200 | 230 |
| | КГ | 10 | 177,1 | 12,9 | 167,9 | 186,3 | 160 | 196 |
| 7 ДЕН | ИГ-1 | 10 | 214,4 | 31,9 | 191,6 | 237,2 | 170 | 275 |
| | ИГ-2 | 10 | 217,9 | 12,8 | 208,7 | 227,1 | 195 | 235 |
| | КГ | 10 | 192,2 | 12,8 | 183,1 | 201,3 | 170 | 210 |
| 14 ДЕН | ИГ-1 | 10 | 236,1 | 30,8 | 214,1 | 258,1 | 190 | 297 |
| | ИГ-2 | 10 | 227,6 | 13,8 | 217,7 | 237,5 | 202 | 245 |
| | КГ | 10 | 205,1 | 13,6 | 195,3 | 214,8 | 180 | 222 |
| 21 ДЕН | ИГ-1 | 10 | 223,6 | 32,3 | 200,5 | 246,7 | 171 | 280 |
| | ИГ-2 | 10 | 218,7 | 16,5 | 206,9 | 230,5 | 190 | 250 |
| | КГ | 10 | 192,3 | 13,3 | 182,8 | 201,8 | 170 | 210 |
| 28 ДЕН | ИГ-1 | 10 | 235,4 | 31,2 | 213,1 | 257,7 | 192 | 295 |
| | ИГ-2 | 9 | 227,6 | 18,8 | 213,1 | 241,9 | 198 | 245 |
| | КГ | 10 | 200,1 | 12,9 | 190,8 | 209,2 | 175 | 215 |
| 35 ДЕН | ИГ-1 | 10 | 236,4 | 27,6 | 216,7 | 256,1 | 200 | 290 |
| | ИГ-2 | 9 | 229,6 | 18,4 | 215,4 | 243,6 | 200 | 250 |
| | КГ | 10 | 204,4 | 12,1 | 195,7 | 213,1 | 180 | 218 |

контролна група (КГ); испитувана група – I (ИГ- 1); испитувана група – II (ИГ- 2)

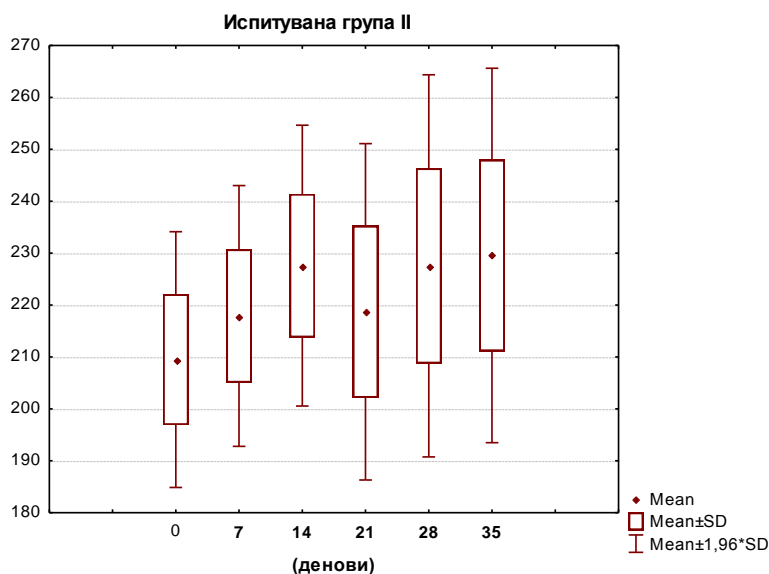
График 15. Дескриптивна анализа на тежината на стаорците во ИСПИТУВАНА ГРУПА- I во шест времиња на мерење



Анализата укажа дека во ИСПИТУВАНАТА ГРУПА – I просечната вредност на тежината на стаорците шестте времиња на мерење (0, 7, 14, 21, 28 и 35 ден) изнесува консеквентно $225,9 \pm 24,7$ CI 95% (209,2-244,6) v.s $214,4 \pm 31,9$ CI 95% (191,6-237,2) v.s $236,1 \pm 30,8$ CI 95% (214,1-248,1) v.s $223,6 \pm 32,3$ CI 95% (200,5-246,7) v.s $235,4 \pm 31,2$ CI 95% (213,1-257,7) v.s $236,4 \pm 27,6$ CI 95% (216,7-256,1). Минималната односно максималната вредност на тежината на стаорците во оваа група во “0 ДЕН“ изнесува 195 v.s 280; во “7 ДЕН“ изнесува 170 v.s 275; на “14 ДЕН“ изнесува 190 v.s 297; на “21 ДЕН“ изнесува 171 v.s 280; на “28 ДЕН“ изнесува 192 v.s 295; и на “35 ДЕН“ изнесува 200 v.s 290. Табеларниот приказ на дескриптивната анализа на испитуваната група - I според тежина на стаорците е дадена во Табела 21 и График 15.

Во ИСПИТУВАНА ГРУПА – II, просечната вредност на тежината на стаорците во шестте времиња на мерење (0, 7, 14, 21, 28 и 35 ден) изнесува консеквентно $209,5 \pm 12,6$ CI 95% (200,5-218,5) v.s $217,9 \pm 12,8$ CI 95% (208,7-227,1) v.s $227,6 \pm 13,8$ CI 95% (217,7-237,5) v.s $218,7 \pm 16,5$ CI 95% (206,9-230,5) v.s $227,6 \pm 18,8$ CI 95% (213,1-241,9) v.s $229,6 \pm 18,4$ (215,4-243,6). Минималната односно максималната вредност на тежината на стаорците во оваа група во “0 ДЕН“ изнесува 200 v.s 230; во “7 ДЕН“ изнесува 195 v.s 235; на “14 ДЕН“ изнесува 202 v.s 245; на “21 ДЕН“ изнесува 190 v.s 250; на “28 ДЕН“ изнесува 198 v.s 245; и на “35 ДЕН“ изнесува 200 v.s 250. Дескриптивната анализа на испитуваната група - II според тежината на стаорците е дадена во Табела 21 и График 16.

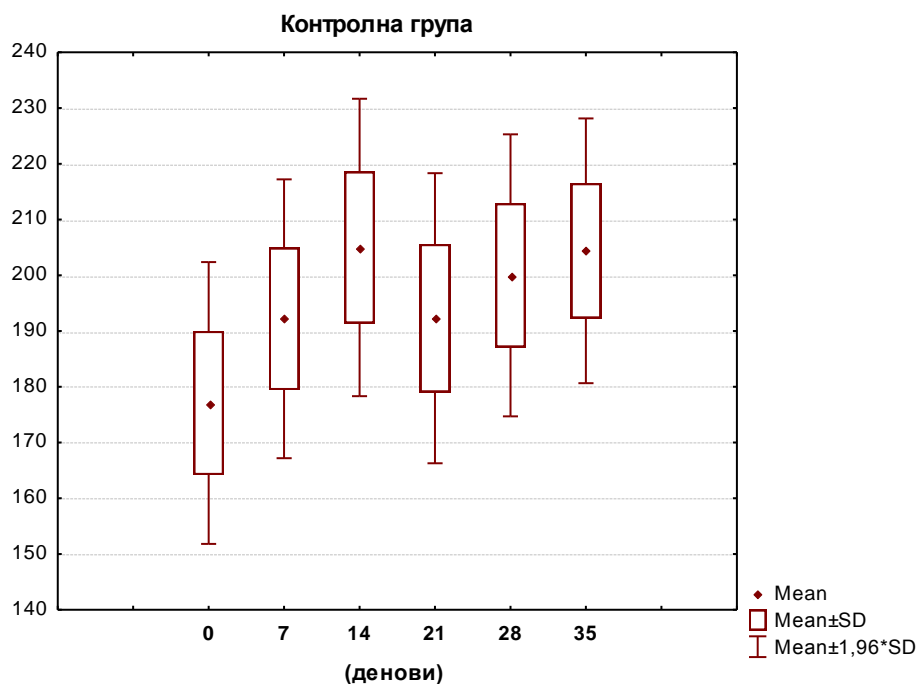
График 16. Дескриптивна анализа на тежината на стаорците во ИСПИТУВАНА ГРУПА-II во шест времиња на мерење



Стаорците во КОНТРОЛНАТА ГРУПА се третирани со интраперитонеална апликација на физиолошки раствор со волумен од 0,5 мл. Анализата во контролната група, укажа дека просечната вредност на тежината на стаорците во шесте времиња на мерење (0, 7, 14, 21, 28 и 35 ден) изнесува консеквентно $177,1 \pm 12,9$ CI 95% (167,9-186,3) v.s $192,2 \pm 12,8$ CI 95% (183,1-201,3) v.s $205,1 \pm 13,6$ CI 95% (195,3-214,8) v.s $192,3 \pm 13,3$ CI 95% (182,8-201,8) v.s $200,1 \pm 12,9$ CI 95% (190,8-209,2) v.s $204,4 \pm 12,1$ (195,7-213,1). Минималната односно максималната вредност на тежината на стаорците во оваа група во “0 ДЕН“ изнесува 160 v.s 196; во “7 ДЕН“ изнесува 170 v.s 210; на “14 ДЕН“ изнесува 180 v.s 222; на “21 ДЕН“ изнесува 170 v.s 210; на “28 ДЕН“ изнесува 175 v.s 215; и на “35 ДЕН“ изнесува 180 v.s 218.

Дескриптивната анализа на КОНТРОЛНАТА ГРУПА според тежината на стаорците е дадена во Табела 21 и График 17.

График 17. Дескриптивна анализа на тежината на стаорците во КОНТРОЛНА ГРУПА во шест времиња на мерење



4.7. Анализа според клиничко зараснување на екстракциона рана

Кај стаорците од трите групи (една контролна и две испитувани) непосредно по екстракцијата на првиот молар во долната вилица десно направена е евалуација на клиничкото зараснување на екстракционата рана и/или постоење на знаци на

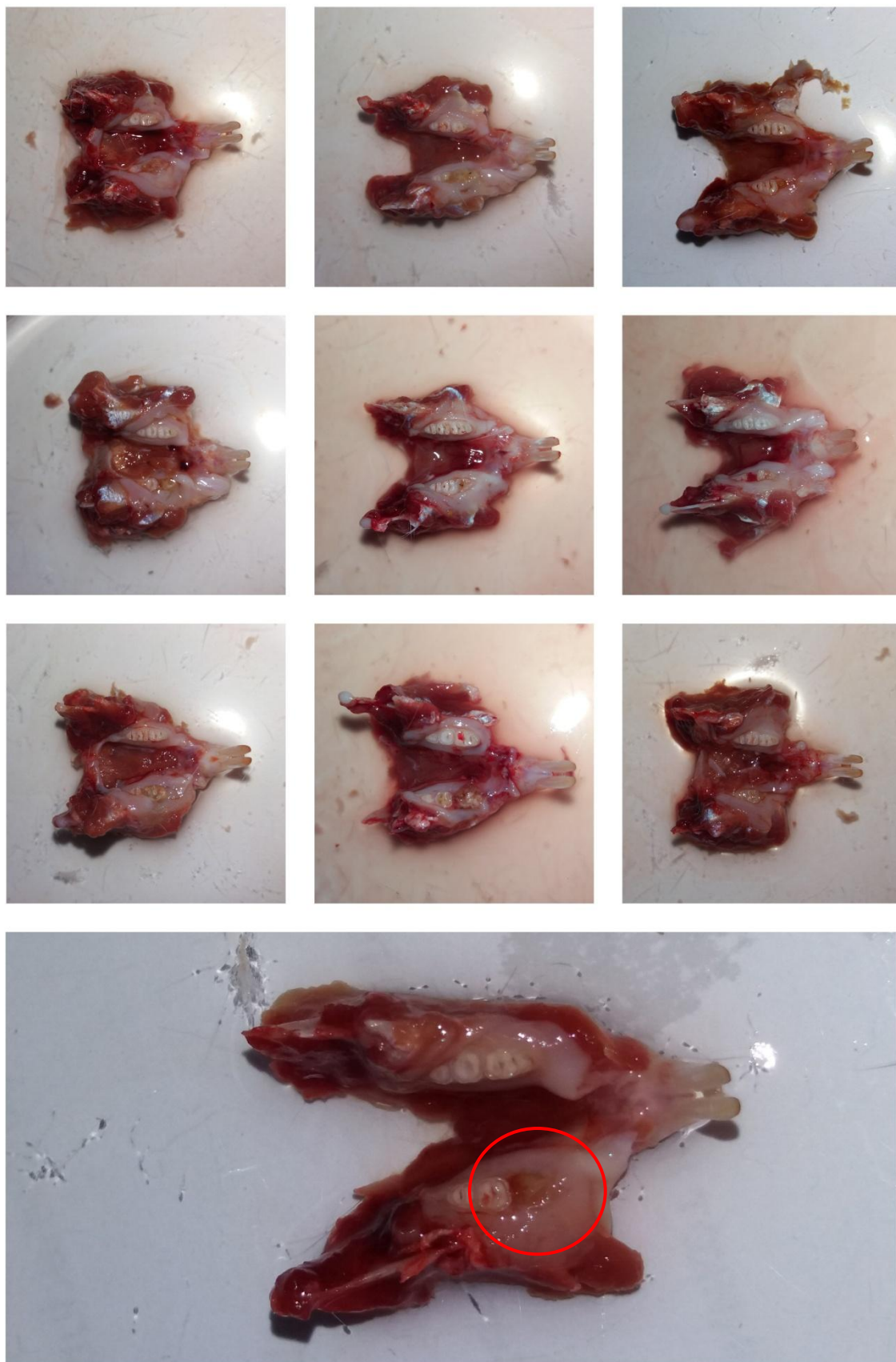
остеонекроза. Степенот на клиничките параметри е оценет на скала од 0-3, со што нула означува отсуство на клинички знаци на несоодветно зараснување, воспаление, инфекција и експонирана коска, а три означува силно присуство на овие клинички знаци. На сликите 16, 17 и 18 се прикажани клиничките фотографии од екстирпираниите вилицы, при што најголемата слика е репрезентативната за соодветната група.

Дескриптивната анализа според степен на клиничкото зараснување на екстракционата рана по групи, укажа дека во ИСПИТУВАНА ГРУПА I третирана со золедронска киселина има 3 (30%) случаи со степен “еден“, 6 (60%) со степен “два“ и 1 (10%) со степен “три“, а нема ниту еден случај на “нула“ степен на клиничко зараснување на екстракционата рана (Табела 22). Во ИСПИТУВАНА ГРУПА II третирана со золедронска киселина и геранилгераниол има по 4 (44,4%) на случаи со степен “нула“ и степен “еден“, само 1 (11,2%) со степен “два“ и ниеден случај со степен “три“. Во КОНТРОЛНАТА ГРУПА третирана со физиолошки раствор има 7 (70%) случаи со степен “нула“, 2 (20%) со степен “еден“, 1 (10%) со степен “два“ и ниеден случај со степен “три“ на клиничкото зараснување на екстракционата рана (Табела 22). Графичкиот приказ на дескриптивната анализа според степен на клиничкото зараснување на екстракционата рана по групи е даден на График 18 подолу во текстот.

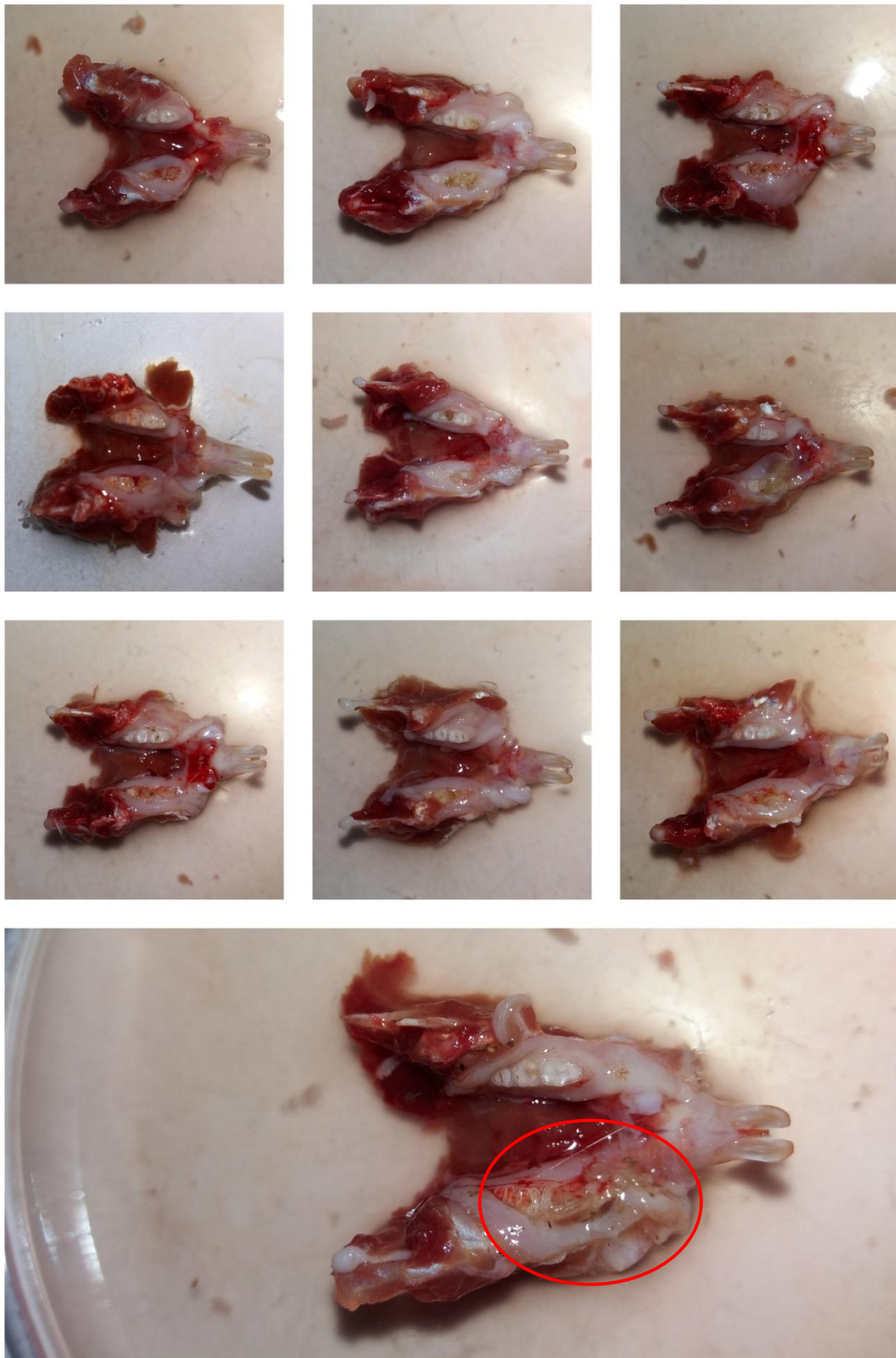
Табела 22. Дескриптивна анализа според степен на клиничкото зараснување на екстракционата рана групи

| Референтна група | | Степен на клиничко зараснување на екстракционата рана | | | | Вкупно |
|------------------|------|---|-------|-------|-----|--------|
| | | нула | еден | два | три | |
| ИГ-1 | Број | 0 | 3 | 6 | 1 | 10 |
| | % | 0% | 30% | 60% | 10% | |
| ИГ-2 | Број | 4 | 4 | 1 | 0 | 9 |
| | % | 44,4% | 44,4% | 11,2% | 0% | |
| КГ | Број | 7 | 2 | 1 | 0 | 10 |
| | % | 70% | 20% | 10% | 0% | |

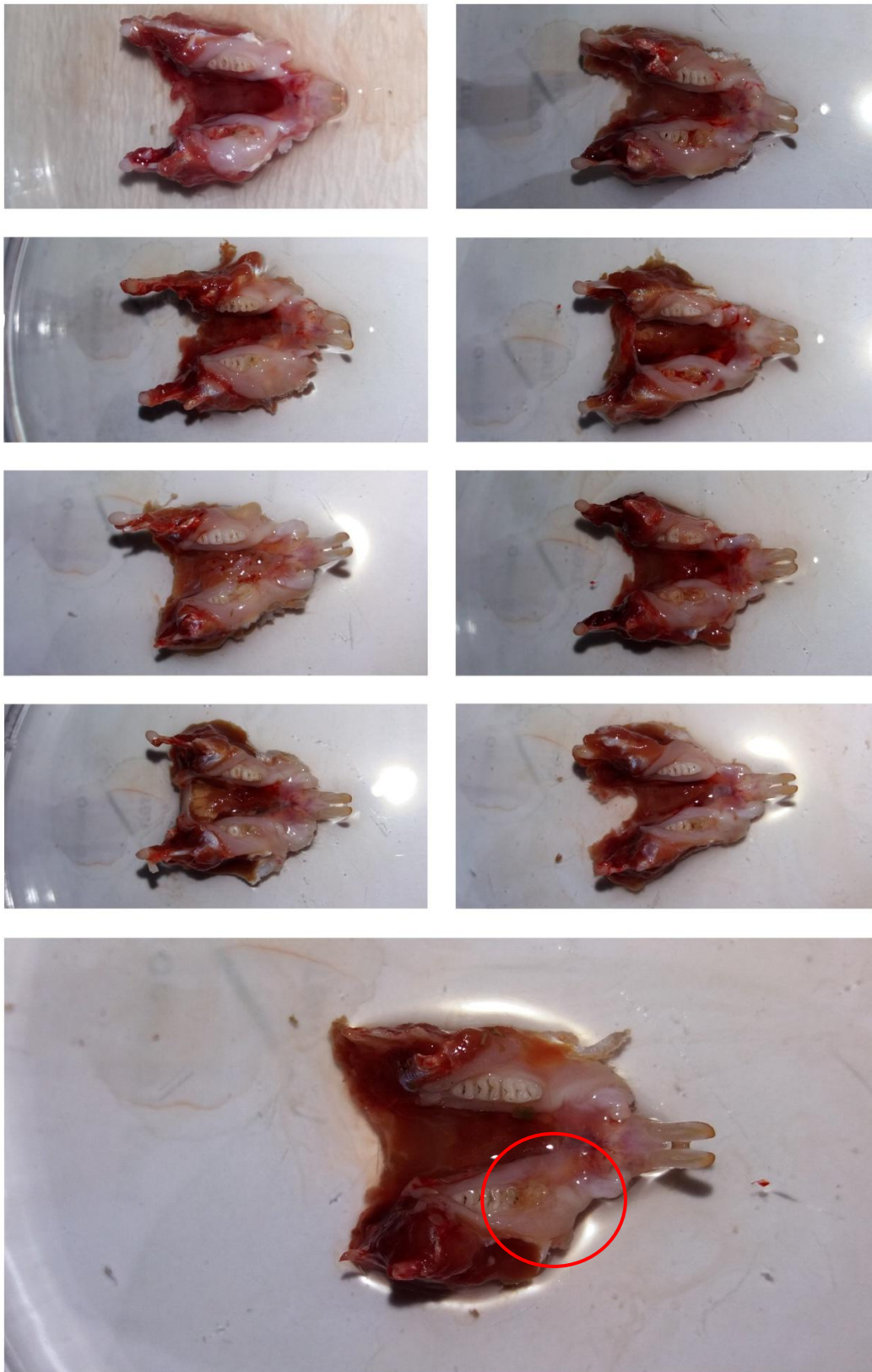
контролна група (КГ); испитувана група – I (ИГ- 1); испитувана група – II (ИГ- 2)



Сл. 16. Приказ на екстирпираниите вилици и клиничкиот наод на екстракционата рана (црвен круг) кај стаорците од контролната група

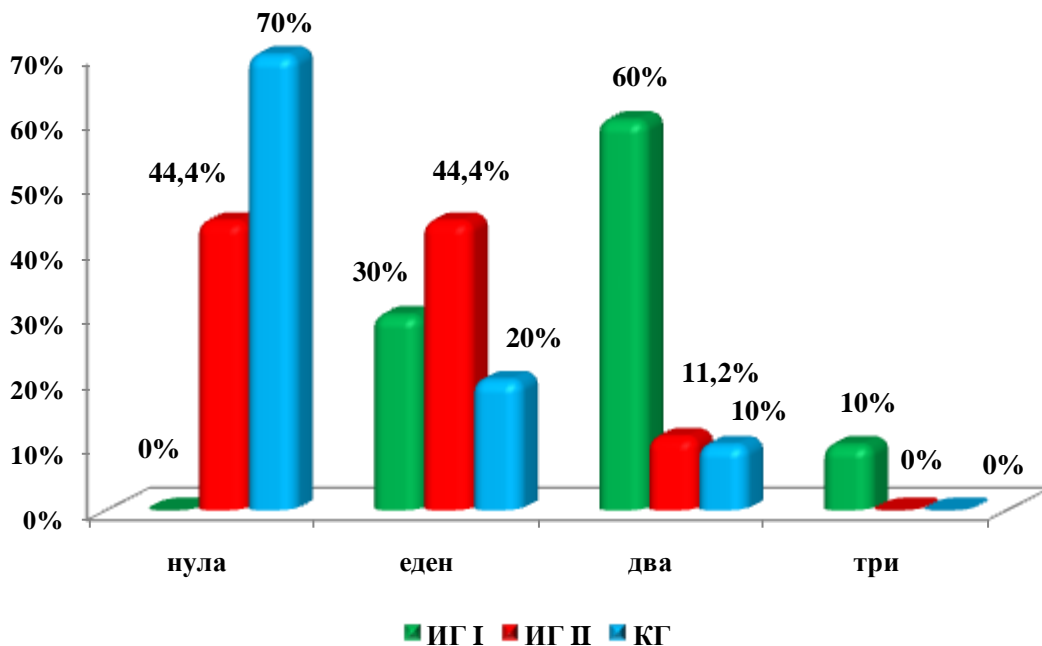


Сл. 17. Приказ на екстирпираниите вилици и клиничкиот наод на екстракционата рана (црвен круг) кај стаорците од првата испитувана група (золедронска киселина)



Сл. 18. Приказ на екстирпираниите вилици и клиничкиот наод на екстракционата рана (црвен круг) кај стаорците од втората испитувана група (золедронска киселина + геранилгераниол)

График 18. Дескриптивна анализа според степен на клиничкото зараснување на екстракционата рана по групи



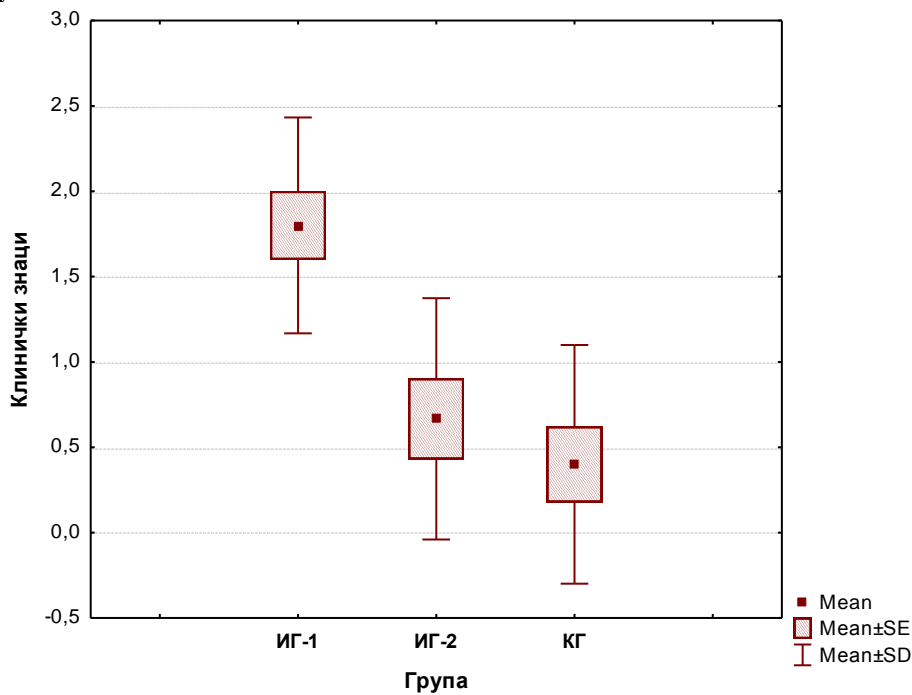
За целите на истражувањето, степенот на клиничкото зараснување на екстракционата рана од 0-3 за секоја од трите групи е престаен преку просек и стандардна девијација (Табела 23 и График 19). Анализата по групи укажа на следните резултати и тоа: а) ИГ-1 ($1,8 \pm 0,6$); б) ИГ-2 ($0,7 \pm 0,7$) и в) КГ ($0,4 \pm 0,7$). При тоа најмала просечна вредност на степенот на клиничко зараснување на екстракционата рана (најмал степен на оштетување), има во КГ следено со ИГ-2 и ИГ-1. За $p < 0,05$, согледана е статистички сигнификантна разлика меѓу трите групи во однос на просечните вредности на степенот на клиничкото зараснување на екстракционата рана за Kruskal-Wallis H test: Chi Square=13,385 df=2 $p=0,001$.

Табела 23. Просечни вредности на степен на клиничко зараснување на екстракционата рана

| Група | Број (N) | Просек (Mean) | Стандардна девијација Std. Deviation |
|-------|----------|---------------|--------------------------------------|
| ИГ-1 | 10 | 1,8 | 0,6 |
| ИГ-2 | 9 | 0,7 | 0,7 |
| КГ | 10 | 0,4 | 0,7 |

контролна група (КГ); испитувана група – I (ИГ- 1); испитувана група – II (ИГ- 2)
 Kruskal-Wallis H test: Chi Square=13,385 df=2 $p=0,001$ * *сигнификантно за $p < 0,05$

График 19. Просечни вредности на степен на клиничко зараснување на екстракционата рана по групи



Во рамките на истражувањето направена е споредба на просечните вредности на степенот на клиничко зараснување на екстракционата рана помеѓу групите во три комбинации и тоа: ИГ-1/ИГ-2, ИГ-1/КГ, и ИГ-2/КГ (Табела 24). За $p < 0,05$ анализата укажа на статистички сигнификантна разлика помеѓу ИГ-1/ИГ-2 и ИГ-1/КГ во однос на просечните вредности на степенот на клиничко зараснување на екстракционата рана за консеквентно Mann Whitney U test=12 Z=2,851 $p=0,004$ v.s. Mann Whitney U test=9 Z=3,266 $p=0,001$ (Табела 24). Анализата не укажа на сигнификантна разлика, $p > 0,05$, помеѓу ИГ-2/КГ во однос на просечните вредности на степенот на клиничко зараснување на екстракционата рана при Mann Whitney U test=34 Z=0,974 $p=0,330$.

Табела 24. Споредба на просечни вредности на степен на клиничкото зараснување на екстракционата рана помеѓу групи

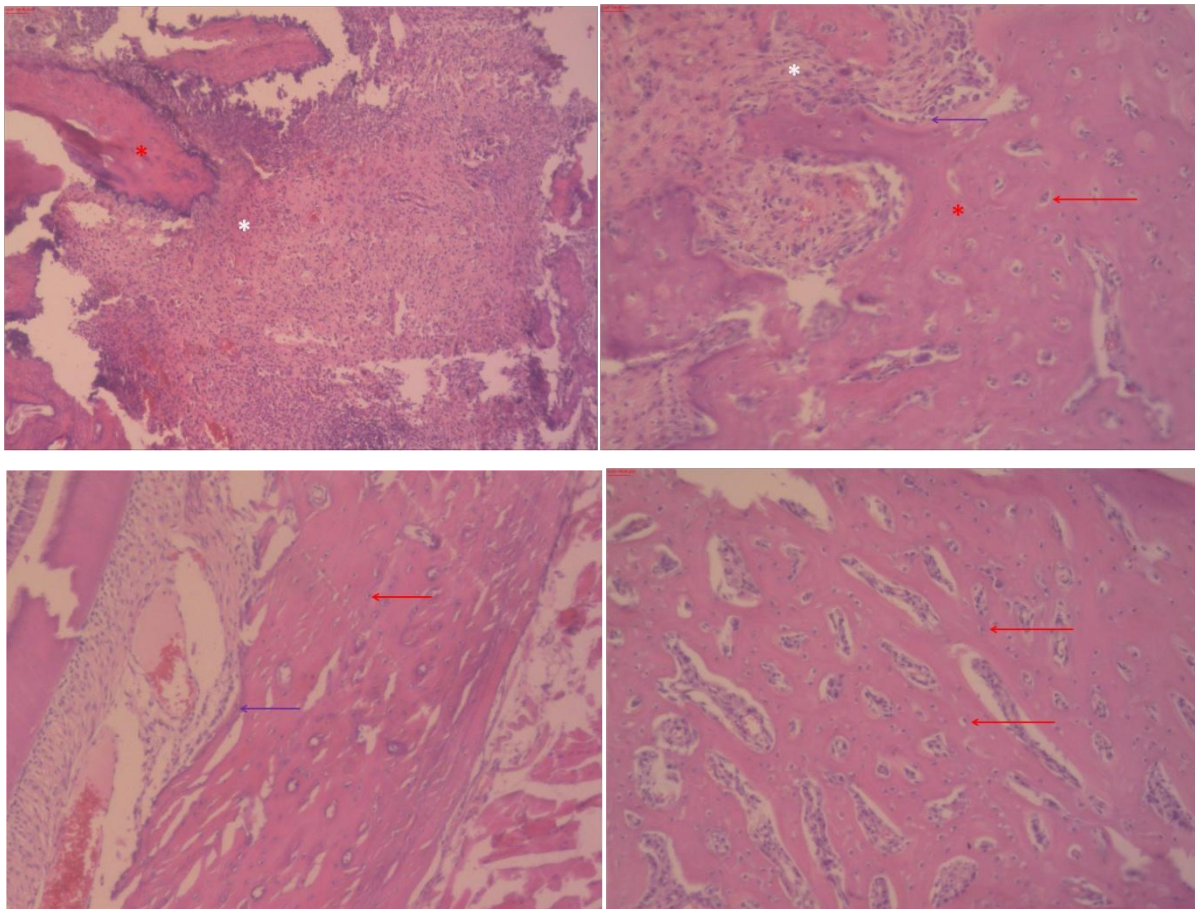
| Mann-Whitney U Test | ИГ-1/ИГ-2 | ИГ-1/КГ | ИГ-2/КГ |
|------------------------|-----------|---------|---------|
| Mann-Whitney U | 12 | 9 | 34,5 |
| Z | 2,851 | 3,266 | 0,974 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | 0,004* | 0,001* | 0,330 |

контролна група (КГ); испитувана група – I (ИГ- 1); испитувана група – II (ИГ- 2)

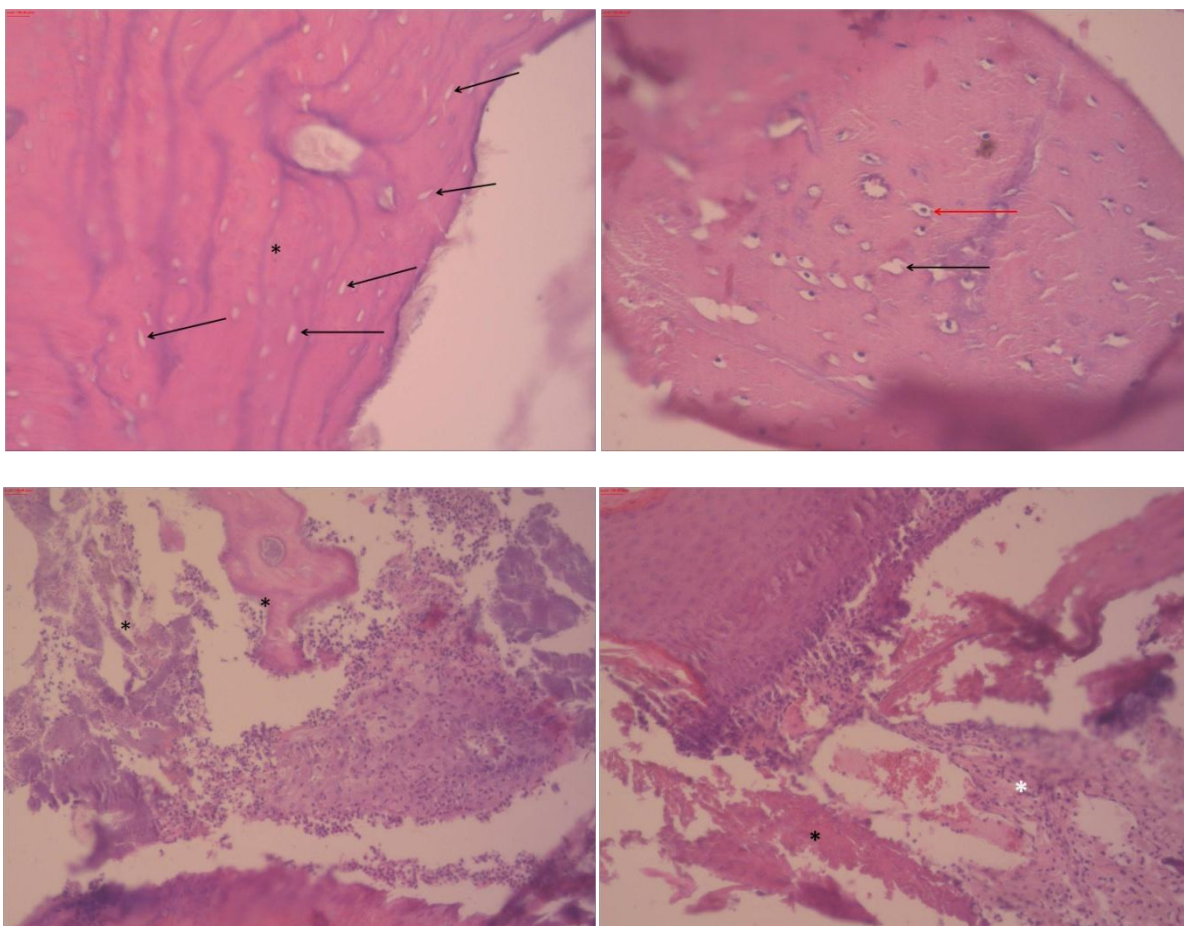
*сигнификантно за $p < 0,05$

4.8. Патохистолошка анализа по групи

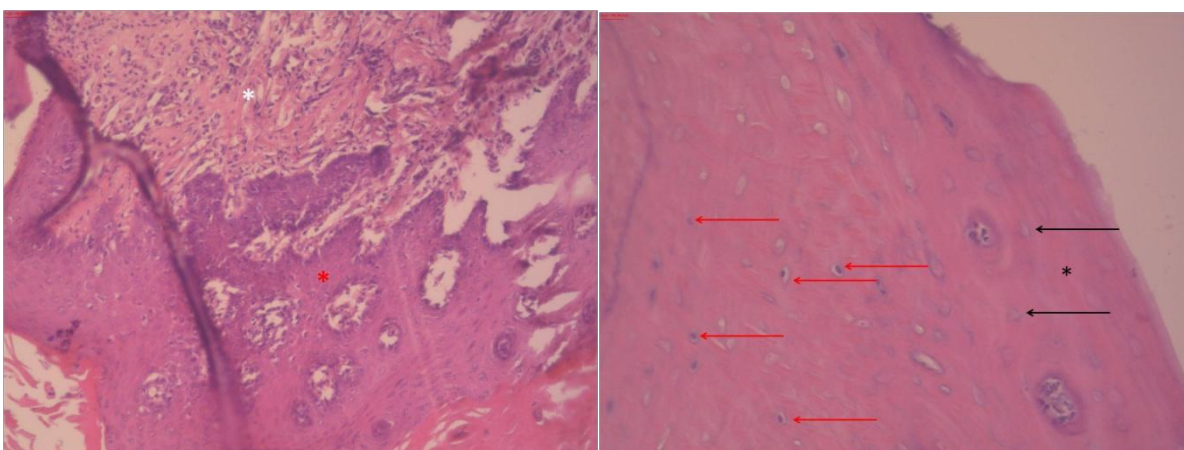
Патохистолошката анализа е направена согласно принципот на слепа проба за следните параметри: хистолошка остеонекроза, хистолошки степен на остеонекроза, број на празни лакуни без присуство на остеоцити и епителна пролиферација. На сликите 19, 20 и 21 се прикажани репрезентативни хистолошки пресеци од секоја група со соодветните параметри кои се важни за проценка на спомнатите параметри.



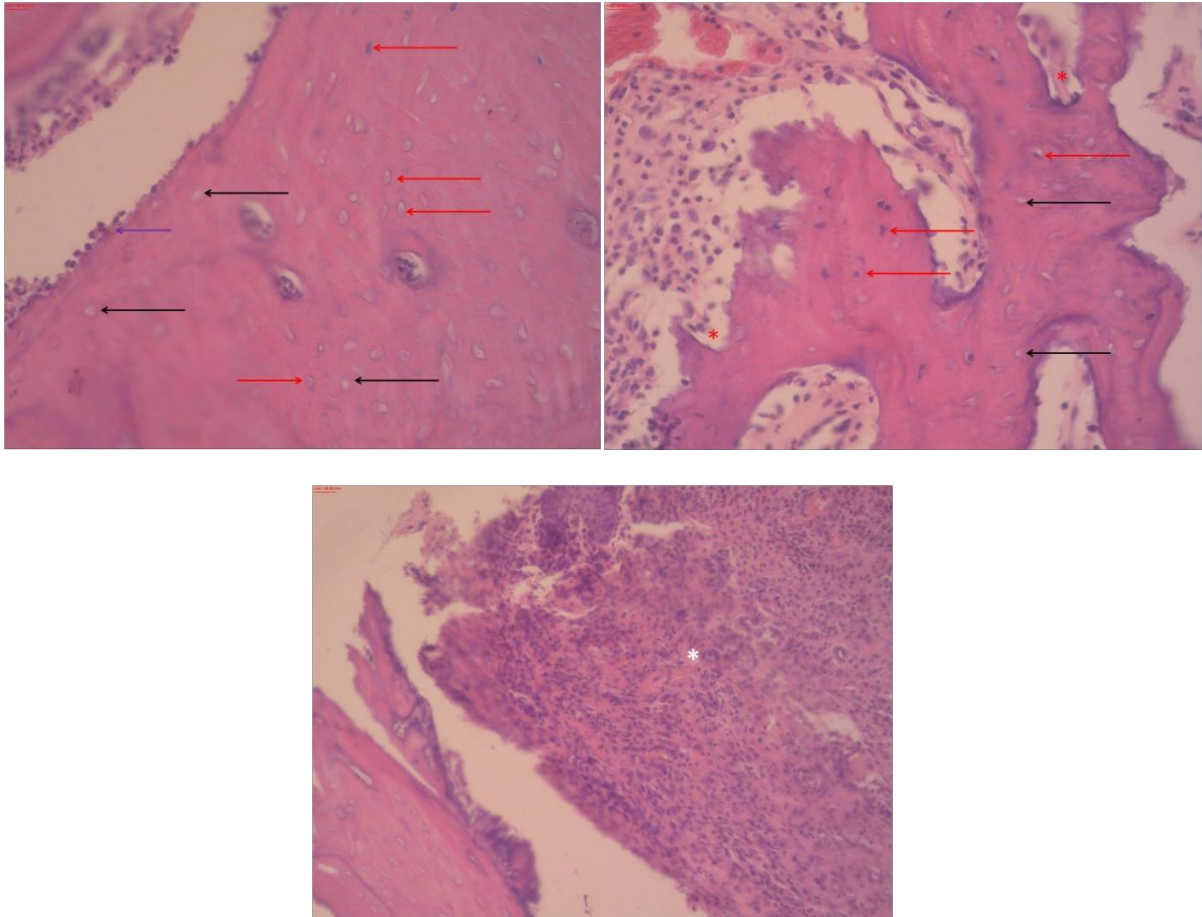
Сл. 19. Хистолошки приказ на виличната коска две недели по екстракција на заб кај контролната група (Hematoxylin & Eosin бојење) *- витална коска; ** - воспалителен инфилтрат и пролиферација; црвена стрелка- лакуна со остеоцит; виолетова стрелка- остеобласти



Сл. 20. Хистолошки приказ на виличната коска две недели по екстракција на заб кај првата испитувана група, третирана со золедронска киселина (Hematoxylin & Eosin боење) *- некроза; * - воспалителен инфилтрат; црна стрелка- празна лакуна (без остеоцит); црвена стрелка- лакуна со остеоцит;



Сл. 21. Хистолошки приказ на виличната коска две недели по екстракција на заб кај втората испитувана група, третирана со золедронска киселина и геранилгераниол (Hematoxylin & Eosin боење); * - витална коска; * - некроза; * - воспалителен инфилтрат; црна стрелка- празна лакуна (без остеоцит); црвена стрелка- лакуна со остеоцит; виолетова стрелка- остеобласти (продолжува)



Сл. 21 (продолжение). Хистолошки приказ на виличната коска две недели по екстракција на заб кај втората испитувана група, третирана со золедронска киселина и геранилгераниол (Hematoxylin & Eosin боење); * - витална коска; *- некроза; ** - воспалителен инфилтрат; црна стрелка- празна лакуна (без остеоцит); црвена стрелка- лакуна со остеоцит; виолетова стрелка- остеобласти

4.8.1. Анализа според присуство/отсуство на хистолошка остеонекроза по групи

Стаорците од секоја од трите групи се анализирани според присуство/отсуство на хистолошка остеонекроза. Присуство на хистолошка остеонекроза е утврдена кај 8 (80%) од стаорците на ИГ-1, 2 (22,1%) од стаорците во ИГ-2 и кај ниеден 0 (0%) од стаорците во КГ (Табела 25). За $p < 0,05$, постои статистички сигнификантна разлика помеѓу трите групи во однос на присуство/отсуство на хистолошка остеонекроза за Fisher-Freeman-Halton exact test: $p = 0,0002$. Дополнителната анализа укажа дека за $p < 0,05$, постои статистички сигнификантна разлика помеѓу ИГ-1/ИГ-2 и ИГ-1/КГ за консеквентно Fisher exact two tailed test: $p = 0,023$ и Fisher exact two tailed test: $p = 0,0004$. За $p > 0,05$, нема сигнификантна разлика во присуство/отсуство на хистолошка остеонекроза помеѓу ИГ-2/КГ за Fisher exact two tailed test: $p = 0,2105$.

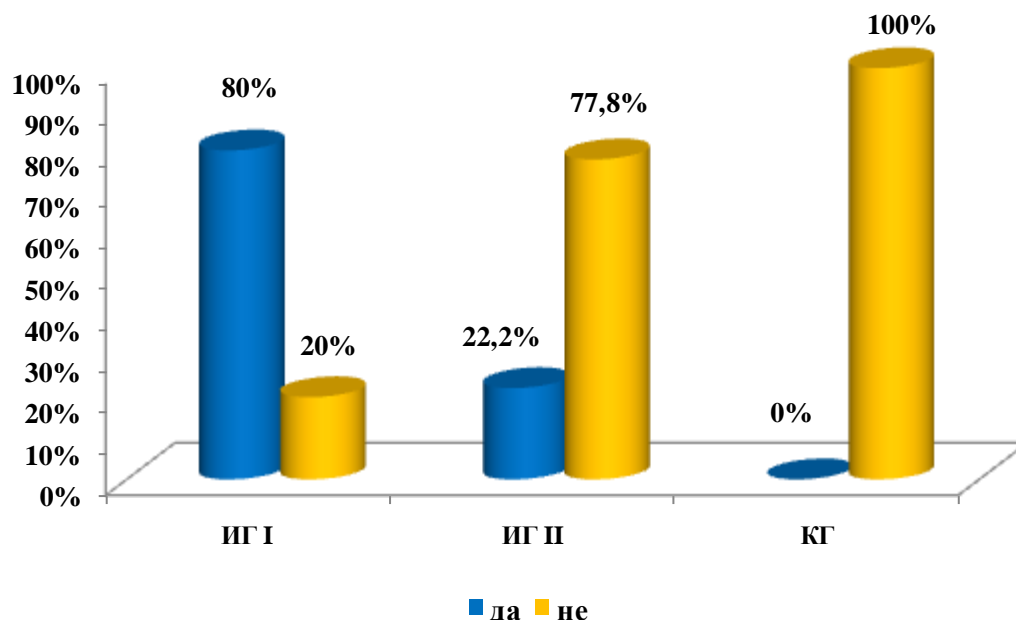
Табела 25. Дескриптивна анализа според присуство на хистолошка остеонекроза по групи

| Група | | Хистолошка остеонекроза | | Вкупно |
|-------|------|-------------------------|-------|--------|
| | | да | не | |
| ИГ-1 | Број | 8 | 2 | 10 |
| | % | 80% | 20% | |
| ИГ-2 | Број | 2 | 7 | 9 |
| | % | 22,2% | 77,8% | |
| КГ | Број | 0 | 10 | 10 |
| | % | 0% | 100% | |

контролна група (КГ); испитувана група – I (ИГ- 1); испитувана група – II (ИГ- 2)
 Fisher-Freeman-Halton exact test: $p=0,00028$ *сигнификантно за $p<0,05$
 Fisher exact two tailed test: $p=0,0231$ * ИГ-1/ИГ-2
 Fisher exact two tailed test: $p=0,0004$ * ИГ-1/КГ
 Fisher exact two tailed test: $p=0,2105$ ИГ-2/КГ

Графичкиот приказ на дескриптивната анализа на трите групи според присуство/отсуство на хистолошка остеонекроза е даден на График 20 подолу во текстот.

График 20. Дескриптивна анализа според присуство на хистолошка остеонекроза по групи



4.8.2. Анализа според хистолошки степен на остеонекроза по групи

Хистолошкиот степен на остеонекроза во трите групи е оценуван на скала од 0-3, при што нула означува отсуство на остеонекроза, а три означува нејзино најсилно присуство. Степенот е одреден според бројот на празни лакунуи, инфламаторен инфилтрат, васкуларност и знаци на нова коскена депозиција.

Табела 26. Дескриптивна анализа според хистолошки степен на остеонекроза по групи

| Група | Степен на остеонекроза по групи | | | | Вкупно | |
|-------|---------------------------------|-------|-------|-------|--------|----|
| | нула | еден | два | три | | |
| ИГ-1 | Број | 0 | 2 | 4 | 4 | 10 |
| | % | 0% | 20% | 40% | 40% | |
| ИГ-2 | Број | 3 | 4 | 2 | 0 | 9 |
| | % | 33,3% | 44,4% | 22,3% | 0% | |
| КГ | Број | 10 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| | % | 100% | 0% | 0% | 0% | |

контролна група (КГ); испитувана група – I (ИГ- 1); испитувана група – II (ИГ- 2)

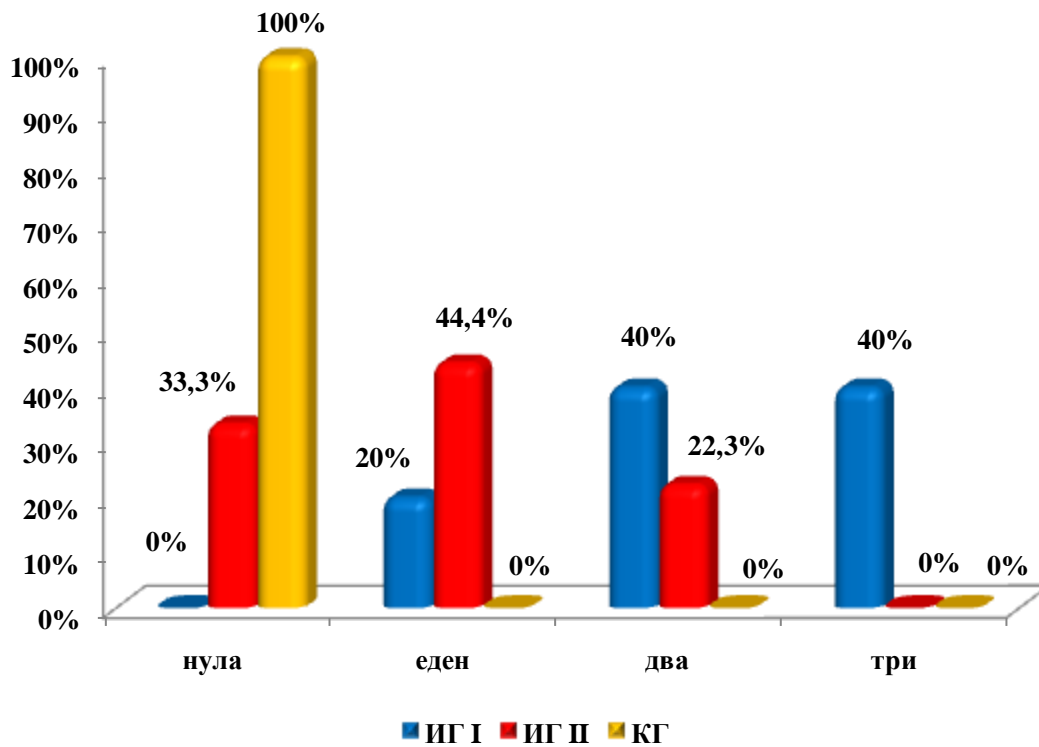
Дескриптивната анализа според хистолошкиот степен на остеонекроза по групи, укажа дека во ИСПИТУВАНАТА ГРУПА I третирана со золедронска киселина има 2 (20%) случаи со степен “еден“, по 4 (40%) со степен “два“ и степен “три“ на остеонекроза. Нема ниту еден случај на “нула“ степен на остеонекроза (Табела 26).

Во ИСПИТУВАНАТА ГРУПА II третирана со золедронска киселина и геранилгераниол има 3 (33,3%) на случаи со хистолошки степен на остеонекроза “нула“, 4 (44,4%) со степен “еден“, 2 (22,3%) со степен “два“ и ни еден случај со степен “три“.

Во КОНТРОЛНАТА ГРУПА третирана со физиолошки раствор сите 10 (100%) случаи се со хистолошки степен на остеонекроза од “нула“(Табела 26).

Графичкиот приказ на дескриптивната анализа според хистолошкиот степен на остеонекроза по групи е даден на График 21 подолу во текстот.

График 21. Дескриптивна анализа според хистолошки степен на остеонекроза по групи



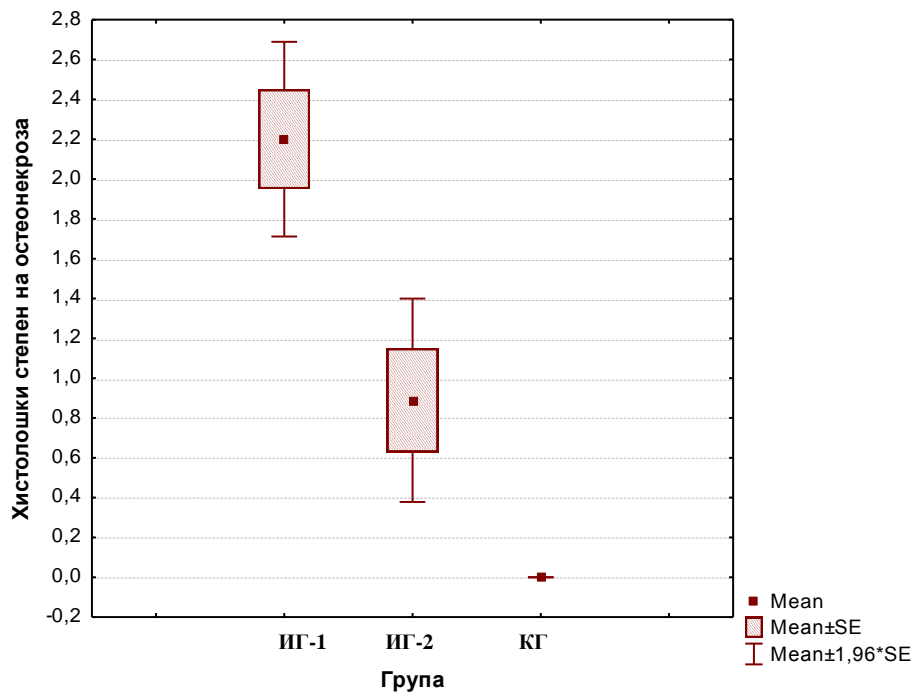
За целите на истражувањето, хистолошкиот степен на остеонекроза од 0-3 за секоја од трите групи е претставен преку просек и стандардна девијација (Табела 27 и График 22). Анализата по групи укажа на следните резултати и тоа: а) ИГ-1 ($2,2 \pm 0,8$); б) ИГ-2 ($0,9 \pm 0,8$) и в) КГ (0 ± 0). При тоа најмала просечна вредност на хистолошкиот степен на остеонекроза, има во КГ следено со ИГ-II и ИГ-I. За $p < 0,05$, согледана е статистички сигнификантна разлика меѓу трите групи во однос на просечните вредности на хистолошкиот степен на остеонекроза за Kruskal-Wallis H test: Chi Square=20,596 df=2 $p=0,0001$.

Табела 27. Просечни вредности на хистолошки степен на остеонекроза по групи

| Група | Број (N) | Просек (Mean) | Стандардна девијација Std. Deviation |
|-------|----------|---------------|--------------------------------------|
| ИГ-1 | 10 | 2,2 | 0,8 |
| ИГ-2 | 9 | 0,9 | 0,8 |
| КГ | 10 | 0 | 0 |

контролна група (КГ); испитувана група – I (ИГ- 1); испитувана група – II (ИГ- 2)
 Kruskal-Wallis H test: Chi Square=20,596 df=2 $p=0,0001$ * *сигнификантно за $p < 0,05$

График 22. Просечни вредности на хистолошкиот степен на остеонекроза по групи



Во рамките на истражувањето направена е споредба на просечните вредности на хистолошкиот степен на остеонекроза помеѓу групите во три комбинации и тоа: ИГ-1/ИГ-2, ИГ-1/КГ, и ИГ-2/КГ (Табела 28). За $p < 0,05$ анализата укажа на статистички сигнификантна разлика меѓу сите три комбинации на групи и тоа ИГ-1/ИГ-2, ИГ-1/КГ и ИГ-2/КГ, во однос на просекот на хистолошкиот степен на остеонекроза за консеквентно Mann Whitney U test=12 Z=2,800 $p=0,005$ v.s. Mann Whitney U test=0 Z=4,075 $p=0,0001$ v.s. Mann Whitney U test=15 Z=2,990 $p=0,003$ (Табела 28).

Табела 28. Споредба на просечни вредности на хистолошки степен на остеонекроза помеѓу групи

| Mann-Whitney U Test | ИГ-1/ИГ-2 | ИГ-1/КГ | ИГ-2/КГ |
|------------------------|-----------|---------|---------|
| Mann-Whitney U | 12 | 0 | 15 |
| Z | 2,800 | 4,075 | 2,990 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | 0,005* | 0,0010* | 0,003* |

контролна група (КГ); испитувана група – I (ИГ- 1); испитувана група – II (ИГ- 2)

*сигнификантно за $p < 0,05$

4.8.3. Анализа според број на празни лакуни без присуство на остеоцити по групи

Во рамките на истражувањето, примероците од трите групи се анализирани во однос на бројот на празни лакуни без присуство на остеоцити. Оваа анализа е аплицирана за секоја од трите групи поединечно. Дескриптивната анализа и графичкиот приказ е даден во Табела 29 и График 23 подолу во текстот.

Табела 29. Дескриптивна анализа на број на празни лакуни без присуство на остеоцити по групи

| Група | Број (N) | Просек (Mean) | Стандардна девијација Std. Deviation | Минимум (Min) | Максимум (Max) |
|-------|----------|---------------|--------------------------------------|---------------|----------------|
| ИГ-1 | 10 | 9,3 | 3,8 | 1 | 15 |
| ИГ-2 | 9 | 5,1 | 3,0 | 2 | 10 |
| КГ | 10 | 0,2 | 0,4 | 0 | 1 |

контролна група (КГ); испитувана група – I (ИГ- 1); испитувана група – II (ИГ- 2)
Kruskal-Wallis H test: Chi Square=21,322 df=2 p=0,0001* *сигнификантно за p<0,05

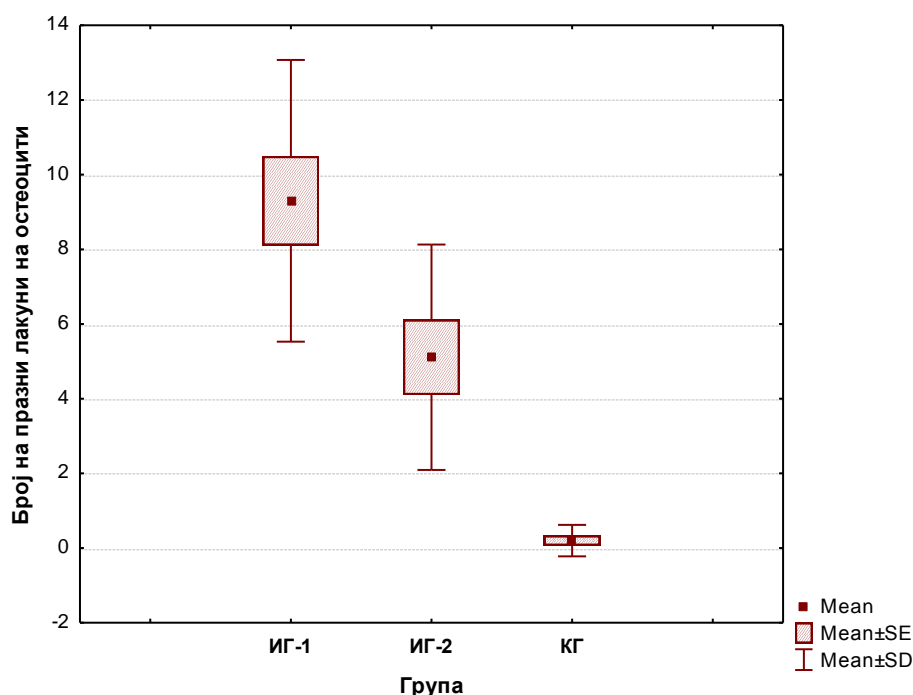
Просечниот број на празни лакуни без присуство на остеоцити во ИСПИТУВАНАТА ГРУПА-I и ИСПИТУВАНА ГРУПА-II и КОНТРОЛНАТА ГРУПА, изнесува консеквентно 9,3±3,8 v.s 5,1±3 v.s 0,2±0,4.

Минималниот односно максималниот број на празни лакуни во ИСПИТУВАНАТА ГРУПА-I изнесувала 1 v.s 15; во ИСПИТУВАНА ГРУПА –II изнесува 2 v.s 10; и во КОНТРОЛНАТА ГРУПА изнесува 0 v.s 1.

За p<0,05, согледана е статистички сигнификантна разлика меѓу трите групи во однос на просечниот број на празни лакуни за Kruskal-Wallis H test: Chi Square=21,322 df=2 p=0,0001.

Направена е споредба на просечниот број на празни лакуни без присуство на остеоцити помеѓу групите во три комбинации и тоа: ИГ-1/ИГ-2, ИГ-1/КГ, и ИГ-2/КГ (Табела 30). За p<0,05 анализата укажа на статистички сигнификантна разлика меѓу сите три комбинации на групи и тоа ИГ-1/ИГ-2, ИГ-1/КГ и ИГ-2/КГ, во однос на просечниот број на празни лакуни за консеквентно Mann Whitney U test=17,5 Z=2,270 p=0,023 v.s. Mann Whitney U test=1 Z=3,842 p=0,0001 v.s. Mann Whitney U test=0 Z=3,828 p=0,0001 (Табела 30).

График 23. Дескриптивна анализа на број на празни лакуну без присуство на остеоцити по групи



Табела 30. Споредба на просечниот број на празни лакуну помеѓу групи

| Mann-Whitney U Test | ИГ-1/ИГ-2 | ИГ-1/КГ | ИГ-2/КГ |
|------------------------|-----------|---------|---------|
| Mann-Whitney U | 17,5 | 1 | 0 |
| Z | 2,270 | 3,842 | 3,828 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | 0,023* | 0,0001* | 0,0001* |

контролна група (КГ); испитувана група – I (ИГ- 1); испитувана група – II (ИГ- 2)

*сигнификантно за $p < 0,05$

4.8.4. Анализа според ткивната пролиферација по групи

Согласно Табела 31, за секоја од трите гупи направена е анализа во однос на присуство/отсуство на ткивна пролиферација (хистолошки). Присуство на ткивна пролиферација е утврдено кај 2 (20%) од стаорците на ИГ-1, 6 (66,7%) од стаорците во ИГ-2 и кај 8 (80%) од стаорците во КГ. За $p < 0,05$, постои статистички сигнификантна разлика помеѓу трите групи во однос на присуство/отсуство на ткивна пролиферација за Fisher-Freeman-Halton exact test: $p = 0,0189$. Дополнителната анализа укажа дека за $p < 0,05$, постои статистички сигнификантна разлика помеѓу ИГ-1/КГ и помеѓу ИГ-1/ИГ-2 за Fisher exact two tailed test: $p = 0,012$ односно Fisher exact two tailed test: $p = 0,049$. За

$p > 0,05$, нема сигнификантна разлика во присуство/отсуство на ткивна пролиферација за помеѓу ИГ-2/КГ за Fisher exact two tailed test: $p = 0,6285$.

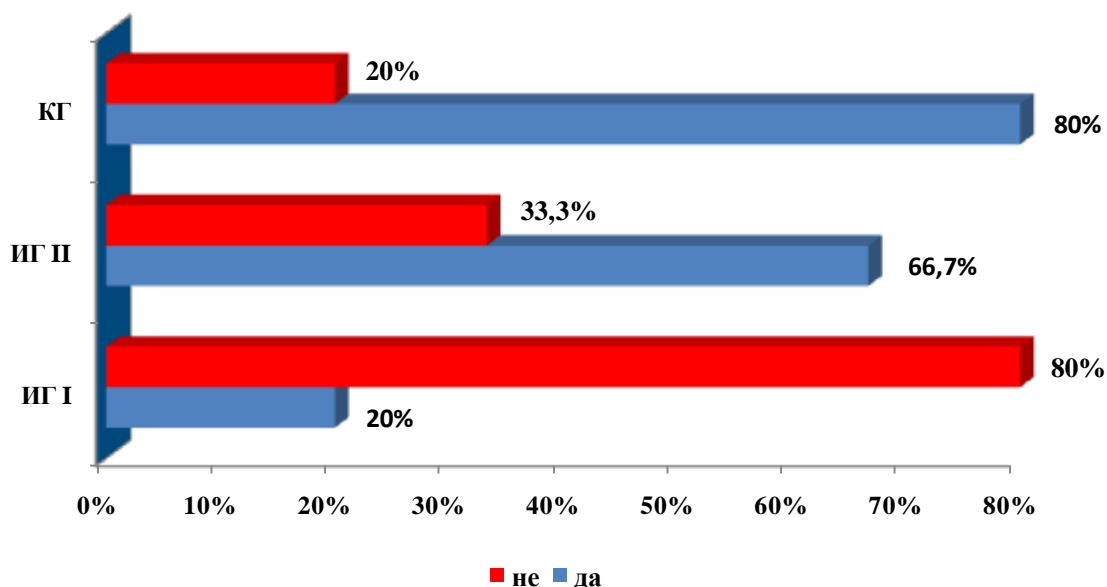
Табела 31. Дескриптивна анализа според ткивна пролиферација по групи

| Група | | Ткивна пролиферација (хистолошко) | | Вкупно |
|-------|------|--------------------------------------|-------|--------|
| | | да | не | |
| ИГ-1 | Број | 2 | 8 | 10 |
| | % | 20% | 80% | |
| ИГ-2 | Број | 6 | 3 | 9 |
| | % | 66,7% | 33,3% | |
| КГ | Број | 8 | 2 | 10 |
| | % | 80% | 20% | |

контролна група (КГ); испитувана група – I (ИГ- 1); испитувана група – II (ИГ- 2)
 Fisher-Freeman-Halton exact test: $p = 0,0189^*$ *сигнификантно за $p < 0,05$
 Fisher exact two tailed test: $p = 0,049$ ИГ-1/ИГ-2
 Fisher exact two tailed test: $p = 0,0121^*$ КГ/ИГ-2
 Fisher exact two tailed test: $p = 0,6285$ ИГ-2/КГ

Графичкиот приказ на дескриптивната анализа на трите групи според присуство/отсуство на ткивна пролиферација по групи е даден на График 24 подолу во текстот.

График 24. Дескриптивна анализа според ткивна пролиферација по групи



4.9. Дискусија

Патофизиолошките механизми, придружните ризик фактори за развој на BRONJ, како и стандардите за превенција и третман во моментов не се целосно расчистени. Претходно направените истражувања се главно ретроспективни и базирани на приказ на случаи, а резултатите од анималните модели не се целосно конзистентни. Дури и во студиите направени на еден ист анимален модел, протоколите кои се користени во смисла на типот, дозирањето и временскиот интервал на апликација на бисфосфонатот, како и неговиот начин на администрација, употребата на дополнителни медикаменти и времето и типот на хируршката траума (единечна или мултипна екстракција), се различни.

Во нашето истражување беше развиен анимален модел на бел стаорец, кој бил искористен и во доста претходни истражувања. Од сите бисфосфонати беше избрана золедронската киселина, бидејќи е најчесто користен интравенски бисфосфонат, а е високо потентна и е поврзана со висок ризик за развој на BRONJ. Аплицираната доза беше 0,06 mg/kg, што кореспондира со дозата која се користи во третирањето на малигнитетите кај луѓето (4 mg месечно). Како и да е, во овој анимален модел золедронската киселина беше аплицирана почесто (еднаш неделно) со цел да се зголеми можноста за развој на BRONJ во пократок временски интервал. Овој анимален модел за развој на BRONJ е во согласност со анималниот модел развиен од страна на Zandi и сор.¹¹⁰ Причината за тоа е што неговото истражување се базира на претходно направена пилот студија, а потоа и рандомизирана контролирана студија, во која се покажал висок процент на развој на BRONJ (над 80%) по екстракција на заб кај стаорците кои биле претходно третирани на опишаниот начин.

Во нашиот анимален модел процентот на развој на BRONJ изнесува 80% кај групата третирана со золедронска киселина во споредба со контролната група каде нема развој на остеонекроза кај ниту еден стаорец, што е целосно во согласност со испитувањето на Zandi и сор.¹¹⁰ Исти резултати добиле и Varba-Recreo и сор. (80%), иако во нивниот анимален модел била користена повисока доза на золедронска киселина од 0,1 мг/кг, како и почеста апликација (три пати неделно) во период од девет недели.¹⁰⁵ Ова укажува дека продолжувањето на третманот со бисфосфонат кај експерименталните животни нема големо влијание врз степенот на развој на BRONJ. Ваков заклучок извлекле и Zandi и сор.¹¹⁰ Maahs и сор. користеле уште повисоки дози на золедронска киселина (0,6 мг/кг) интраперитонеално, а добиле ист степен на

остеонекроза како во нашата студија (80%).⁹⁸ Viassoto и сор. добиле степен на некроза од 100% во нивниот анимален модел каде е употребена иста доза на золедронска киселина како во нашата студија, но истата била давана интравенски, а дополнителен фактор покрај екстракцијата на заб било и предизвикувањето коскен дефект со стругање.⁹⁴ Овие проценти се базираат на хистолошките анализи, т.е. пред се постоење на остенеотични промени според критериумот на број на празни лакуни (без остеоцити) поголем од осум. Нашата студија покажа дека според присуството на остенеотична некроза, бројот на празни лакуни, степенот на остенеотична некроза и пролиферација на епител, испитуваната група 1 (третирана со золедронска киселина и екстракција) значајно се разликува од контролната група (третирана со физиолошки раствор и екстракција). Што се однесува до клиничкото зараснување на екстракционата рана, исто така се доби значајна разлика меѓу првата испитувана група и контролната група, што укажува на отежнато зараснување на раната кај групата третирана со золедронска киселина.

Со цел да се согледа дали геранилгераниолот влијае врз зараснувањето на раната и врз хистолошките параметри на BRONJ, истиот беше додаван во форма на раствор во екстракционата рана секој ден по екстракцијата по времетраење од две недели, во втората испитувана група. Во однос на клиничките знаци се покажа дека геранилгераниолот значајно влијае врз зараснувањето на раната, т.е. присуството на знаци на воспаление, инфекција и експонирана коска. Значајната разлика која постои меѓу оваа група и првата испитувана група и незначајната разлика меѓу оваа група и контролната група укажува на тоа дека екстракционата рана од клинички аспект зараснува без проблеми, т.е. исто како кај стаорците во контролната група. Во однос на хистолошките карактеристики, во оваа испитувана група има значајно намалување на присуството на остенеотична некроза во споредба со првата испитувана група, а во однос на контролната група нема значајни разлики. Како и да е, според бројот на празни лакуни и степенот на остенеотична некроза оваа група се разликува и од првата испитувана група (со што е забележано значајно намалување на вредностите), но и од контролната група бидејќи се покажа значајно отстапување на овие вредности во нагорна линија. Ова може да се објасни со фактот дека золедронска киселина во период пред екстракција на забите веќе се интегрирала во коскената структура и веројатно веќе предизвикала намалување на функцијата на остеокластите и појава на празни лакуни, кои што со додавање на геранилгераниолот не може да се надоместат.

Сепак, разликата меѓу првата и втората испитувана група укажува на тоа дека геранилгераниолот значајно ја подобрил функцијата на остеоκластите и го подобрил метаболизмот на коската по екстракција на забите.

Пролиферацијата на епителот и гранулационото ткиво пак е особено подобро кај втората испитувана група во однос на првата, а е приближна до контролната група без значајни разлики, што укажува на позитивното дејство на геранилгераниолот врз мекото ткиво. Во единствената студија во која е додаван геранилгераниол по екстракција на заби кај стаорци третирани со бисфосфонат покажано е парцијално враќање на функцијата на остеоκластите, т.е. одложено депонирање на коска, а евалуирано со микро-компјутерска томографија. Иако во оваа студија на Nagaoka и сор. администрацијата на геранилгераниол била интравенски, а не локално како во нашиот анимален модел, дозите и времето на екстракција биле различни, исто како и методите за анализа, сепак крајниот резултат е во согласност со нашето истражување.⁸¹

Влијанието на золедронската киселина врз коскените и меките ткива во ин витро услови е докажано во повеќе студии. Ин виво студиите, т.е. оние на анимални модели покажаа дека остеонекроза на вилиците се јавува по администрација на золедронска киселина и екстракција на заб. Оваа некроза обично е придружена со отежнато зараснување на раната, т.е. отсуство на епително зараснување, што укажува на тоа дека ин витро токсичноста и врз коскените и врз меките ткива се пресликува и кај анималните модели. Сепак, тешко е да се предвиди концентрацијата на золедронската киселина која се ослободува од коскениот ткиво и стигнува до оралниот епител и фибробластите по нејзино системско аплицирање, земајќи ги предвид нејзините фармаколошки и фармакокинетички карактеристики. Плазма концентрациите на золедронската киселина брзо се намалуваат од постинфузиона концентрација од 0,9 μM при инфузија од 4 мг во времетраење од 15 минути до максимална концентрација помала од 1% од постинфузионата по 24 часа од инфузијата.¹¹⁹ Како и да е, концентрацијата на медикаментот во коската кај експерименталните стаорци се смета дека е за сто пати поголема од концентрацијата во плазмата и истата се одржува на тоа ниво најмалку 6 месеци по давањето на препаратот.¹¹⁹ Според тоа, релативната близина на клетките од меките ткива до коската во која се акумулирала золедронската киселина како и нејзиното релативно ослободување од коската влијае врз периклеточното изложување на фибробластите и епителните клетки на золедронска киселина. Со тоа се објаснува отежнатото зараснување на раната по екстракцијата на забот. Земајќи предвид дека

геранилгераниолот има влијание во враќањето на функцијата на овие клетки, покажано и во останатите, но и во оваа студија во делот за клеточни ин витро испитувања, очекуван е резултатот на отсуство на клинички знаци на отежнато зараснување на раната по екстракција на заб, добиен во анималниот модел. Овој анимален модел укажува дека меките орални ткива кои се оштетуваат од золедронска киселина, придружени со експонираната коска, може да имаат влијание во настанувањето на BRONJ кај луѓето. BRONJ обично се поврзува со инвазивни процедури кои предизвикуваат траума на меките и коскените ткива. Токсичноста на меките ткива најверојатно е резултат од дејството на бисфосфонатот акумулиран во коската и ослободен за време на остеокластно-посредуваната ресорпција или ремоделирање на виличната коска.

Сепак, во една скорешна студија на Zandi и сор. била испитувана појавата на остеонекроза само при мекоткивната траума или при коскената траума комбинирана со мекоткивна траума кај анимален модел сличен на оној во нашето истражување.⁶³ Во оваа студија остеонекроза се јавила кај 20% од местата кај стаорците каде била извршена само мекоткивна траума. Оваа некроза најверојатно се должи на привременото експонирање на мал дел на алвеоларна коска и загуба на периосталниот крвен проток, последователната коскена исхемија и внесот на бактерии преку мекоткивниот дефект, придружено со значајно изменетиот метаболизам на коската предизвикан од золедронската киселина. За споредба, остеонекрозата кај стаорците кај кои била извршена екстракција, т.е. била нанесена коскена траума, изнесувала над 80%.⁶³ Според тоа, и коскената алвеоларна траума, но и мукозното оштетување имаат важна улога во патофизиологијата на BRONJ. Како и да е, коскениот оштетување е посилен тригер фактор за иницијација на некрозата. Оралната мукоза, стимулирана од ослободувањето на бисфосфонатите, произведува цитокини и фактори кои ја модулираат функцијата на остеобластите и остеокластите и влијаат врз пролиферацијата на ендотелни клетки, што води до некроза на коската.^{120,121} Уште повеќе, со губењето на интегритетот на оралната мукоза, патогените пенетрираат преку оштетениот епител. Коскениот дефект кој настанува од хируршката интервенција (екстракцијата на заб) ја олеснува пенетрацијата на патогените во подлабоките делови на коската, а со тоа и се зголемуваат шансите за појава на BRONJ. Ова ја објаснува и многу повисоката инциденција на BRONJ поврзана со екстракција на заби и други дентоалвеоларни хируршки интервенции споредено со нискиот степен на таканаречените спонтани случаи.

Топикалната употреба на геранилгераниол се покажа како корисна во намалувањето на појавата и степенот на остеонекроза и во зараснувањето на екстракционата рана. Сепак, потребни се многу дополнителни истражувања и потврди на овие заклучоци, со цел изнаоѓање соодветен начин за негова апликација.

Покрај оптималната концентрација на геранилгераниол и времетраењето на неговата апликација, едно од најважните прашања е како геранилгераниолот да се администрира кај пациентите. Системски, третманот со геранилгераниол може да биде проблематичен, бидејќи неговото присуство може да го намали фармаколошкото дејство на бисфосфонатот кој е даден, а со тоа и да ги намали ефектите и позитивниот исход кој е планиран во дадената состојба. Ова може да има катастрофални последици по здравјето на пациентите, особено при малигните состојби, бидејќи се покажа дека геранилгераниолот влијае врз дејството на бисфосфонатите кои содржат азот врз клетките. Овие факти треба да се земат предвид при планирањето на употреба на геранилгераниол во системски терапевтски цели. За разлика од тоа, топикалната употреба на геранилгераниол може да се постигне преку раствори за плакнење на устата по екстракција и при самите хируршки интервенции, како и преку други механизми, т.е. носачи на препарати. Со тоа ќе се избегне системскиот ефект, т.е. интерферирањето со бисфосфонатите.

Во оваа студија ја избравме локалната апликација на геранилгераниолот, затоа што сметаме дека има предност во однос на системската апликација, од претходно наведените причини. Иако системската апликација ќе предизвика побрзо и полесно транспортирање на геранилгераниолот до клетките, особено до длабоките, базални слоеви на мукозата, топикалната употреба директно ја зголемува концентрацијата на препаратот во раната и површните слоеви на клетки, кои имаат особено влијание во заздравувањето, т.е. затворањето на екстракционата рана.

Во неколку студии се користени и останати препарати, особено фактори на раст, како што се bFGF, EGF или VEGF и се покажало дека и тие ги намалуваат негативните ефекти на бисфосфонатите врз различни линии на клетки. Сепак, сметаме дека геранилгераниолот има предност бидејќи директно и целно влијае на местото на ефектот на азотните бисфосфонати (мевалонскиот пат), додека факторите на раст имаат индиректно стимулативно дејство врз клетките со цел подобрување на нивната функција.

5. ЗАКЛУЧОК

Золедронската киселина има токсично дејство врз епителните клетки и гингивалните фибробласти, намалувајќи ја нивната виталност и метаболизам, како и нивната морфолошка структура. Ин виво анималниот модел ја покажа поврзаноста меѓу апликацијата на золедронска киселина и екстракцијата на заб со појавата на бисфосфонатно-поврзаната остеонекроза на вилиците. Третманот со золедронска киселина покажа отежнато зараснување на раната и хистолошки знаци на остеонекроза.

Додавањето на геранилгераниол на епителните клетки и гингивалните фибробласти делумно, но значајно ја подобри нивната виталност и метаболизам, како и морфолошката структура. Геранилгераниолот додаден како локален раствор во екстракционата рана кај стаорците во анималниот модел третирани со золедронска киселина и екстракција на заб значајно го подобри зараснувањето на екстракционата рана, а го намали појавувањето и степенот на хистолошки потврдена остеонекроза на вилиците, во смисла на намалување на бројот на празни лакуни без остеоцити, подобрување на васкуларизацијата и пролиферацијата на ново гранулационо ткиво.

Генерално, резултатите од оваа студија покажуваат дека геранилгераниолот може сигнификантно да го намали негативното влијание на високо-потентните азотни бисфосфонати врз коскените и меките ткива, а со тоа и да го спречи или намали појавувањето на остеонекроза на вилиците. Според тоа, геранилгераниолот е ветувачка опција за превенција и третман на оваа состојба, што може да резултира со соодветно зараснување на екстракционата рана, како мекоткивно, така и коскено.

Оваа студија ја открива и потребата од идни истражувања со цел да се изнајде најдобриот терапевтски приод со геранилгераниол, во смисла на неговата концентрација, времетраење на третманот и методот на апликација.

6. РЕФЕРЕНЦИ

1. Qui, SJ, Gibson G, Lundin-Cannon K, Schaffler M. Osteocyte Apoptosis after Acute Matrix Injury in Compact Bone. The Orthopaedic Research Society, San Francisco, Calif, USA, 1997
2. Major P, Lortholary A, Hon J, Abdi E, Mills G, Menssen HD et al. Zoledronic acid is superior to pamidronate in the treatment of hypercalcemia of malignancy: a pooled analysis of two randomized, controlled clinical trials. *J Clin Oncol.* 2001;19(2):558-67
3. Hillner BE, Ingle JN, Chlebowski RT, Gralow J, Yee GC, Janjan NA et al. American Society of Clinical Oncology 2003 update on the role of bisphosphonates and bone health issues in women with breast cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21:4042-57
4. Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L et al. A randomized, placebo-controlled trial of zoledronic acid in patients with hormone-refractory metastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(19):1458-68
5. Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L, et al. Long-term efficacy of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(11):879-82
6. Rosen LS, Gordon D, Tchekmedyian NS, Yanagihara R, Hirsh V, Krzakowski M et al: Long-term efficacy and safety of zoledronic acid in the treatment of skeletal metastases in patients with nonsmall cell lung carcinoma and other solid tumors: a randomized, Phase III, double-blind, placebo-controlled trial. *Cancer.* 2004;100(12):2613-21
7. Coleman RE. Future directions in the treatment and prevention of bone metastases. *Am J Clin Oncol.* 2002;25(6):32-8
8. Holen I, Coleman RE. Bisphosphonates as treatment of bone metastases. *Curr Pharm Des.* 2010;16(11):1262–71
9. Cremers SC, Pillai G, Papapoulos SE. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of bisphosphonates: use for optimisation of intermittent therapy for osteoporosis. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(6):551-70
10. VanBeek ER, Lowik CW, Ebetino FH, Papapoulos SE. Binding and antiresorptive properties of heterocyclecontaining bisphosphonate analogs: structure-activity relationships. *Bone.* 1998;23(5):437-42

11. Russell RG, Xia Z, Dunford JE, Oppermann U, Kwaasi A, Hulley PA et al. Bisphosphonates: an update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1117:209-57
12. Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone.* 2006;38(5):617-27
13. Russell RG, Rogers MJ. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone.* 1999;25(1):97–106
14. Gertz BJ, Holland SD, Kline WF, Matuszewski BK, Porras AG. Clinical pharmacology of alendronate sodium. *Osteoporosis Int.* 1993;3(3):13–6
15. Daley-Yates PT, Dodwell DJ, Pongchaidecha M, Coleman RE, Howell A. The clearance and bioavailability of pamidronate in patients with breast cancer and bone metastases. *Calcif Tissue Int.* 1991;49(6):433-5
16. Lin JH, Chen IW, deLuna FA. On the absorption of alendronate in rats. *J. Pharm. Sci.* 1994;83(12):1741–6
17. Lin JH. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone.* 1996;18(2):75–85
18. Michael WR, King WR, Wakim JM. Metabolism of disodium ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (disodium etidronate) in the rat, rabbit, dog and monkey,” *Toxicol Appl Pharmacol.* 1972;21(4):503–15
19. Rodan GA, Fleisch HA. Bisphosphonates: mechanisms of action. *J Clin Invest.* 1996;87(12):2692–6
20. Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest.* 1991;88(6):2095–105
21. Colucci S, Minielli V, Zambonin G, Cirulli N, Mori G, Serra M et al. Alendronate reduces adhesion of human osteoclast-like cells to bone and bone protein-coated surfaces. *Calcif Tissue Int.* 1998;63(3):230-5
22. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science.* 1989;245(4920):855-7
23. David P, Nguyen H, Barbier A, Baron R. The bisphosphonate tiludronate is a potent inhibitor of the osteoclast vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase. *J Bone Miner Res.* 1996;11(10):1498-507

24. Felix R, Russell RG, Fleisch H. The effect of several diphosphonates on acid phosphohydrolases and other lysosomal enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 1976;429(2):429–38
25. Frith JC, Mönkkönen J, Blackburn GM, Russell RG, Rogers MJ. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(β,γ -dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *J Bone Miner Res*. 1997;12(9):1358-67
26. Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res*. 2006;12(20):6222-30
27. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res*. 1998;13(4):581-9
28. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev*. 1998;19(1):80-100
29. Mackie PS, Fisher JL, Zhou H, Choong PF, Bisphosphonates regulate cell growth and gene expression in the UMR 106-01 clonal rat osteosarcoma cell line. *Br J Cancer*. 2001;84(7):951–8
30. Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch KH, Blaschke S, Gründker C et al. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;291(3):680-6
31. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw-2014 update. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014;72(10):1938-56
32. Coleman R, Woodward E, Brown J, Cameron D, Bell R, Dodwell D et al. Safety of zoledronic acid and incidence of osteonecrosis of the jaw (ONJ) during adjuvant therapy in a randomised phase III trial (AZURE: BIG 01-04) for women with stage II/III breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;127(2):429-38
33. Vahtsevanos K, Kyrgidis A, Verrou E, Katodritou E, Triaridis S, Andreadis CG et al. Longitudinal cohort study of risk factors in cancer patients of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Clin Oncol* 2009;27(32):5356-62
34. Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O'Ryan F et al. Diagnosis and Management of Osteonecrosis of the Jaw: A Systematic Review and International Consensus, *J Bone Miner Res*. 2015;30(1):3–23

35. Henry DH, Costa L, Goldwasser F, Hirsh V, Hungria V, Prausova J et al. Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2011;29(9):1125-32
36. Saad F, Brown JE, Van Poznak C, Ibrahim T, Stemmer SM, Stopeck AT et al. Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Ann Oncol.* 2012;23(5):1341-7
37. Fehm T, Beck V, Banys M, Lipp HP, Hairass M, Reinert S et al. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw (ONJ): Incidence and risk factors in patients with breast cancer and gynecological malignancies. *Gynecol Oncol.* 2009;112(3):605-9
38. Yamazaki T, Yamori M, Ishizaki T, Asai K, Goto K, Takahashi K et al. Increased incidence of osteonecrosis of the jaw after tooth extraction in patients treated with bisphosphonates: a cohort study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012;41(11):1397-403
39. Mozzati M, Arata V, Gallesio G. Tooth extraction in patients on zoledronic acid therapy. *Oral Oncol.* 2012;48(9):817-21
40. Scoletta M, Arata V, Arduino PG, Lerda E, Chiecchio A, Gallesio G et al. Tooth extractions in intravenous bisphosphonate-treated patients: a refined protocol. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71(6):994-9
41. Kunchur R, Need A, Hughes T, Goss A et al. Clinical investigation of C-terminal cross-linking telopeptide test in prevention and management of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(6):1167-73
42. Kyrgidis A, Vahtsevanos K, Koloutsos G, Andreadis C, Boukovinas I, Teleioudis Z et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a case-control study of risk factors in breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2008;26(28):4634-8.
43. Tsao C, Darby I, Ebeling PR, Walsh K, O'Brien-Simpson N, Reynolds E et al. Oral health risk factors for bisphosphonate-associated jaw osteonecrosis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71(8):1360-6
44. Guarneri V, Miles D, Robert N, Diéras V, Glaspy J, Smith I et al.: Bevacizumab and osteonecrosis of the jaw: incidence and association with bisphosphonate therapy in three large prospective trials in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;122(1):181-8

45. Abu-Id, MH, Warnke PH, Springer I, Wiltfang J, Acil Y et al. "Bis-phossy jaws" - high and low risk factors for bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *J Craniomaxillofac Surg.* 2008;36(2):95-103
46. Hoff AO, Toth BB, Altundag K, Johnson MM, Warneke CL, Hu M al. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *J Bone Miner Res.* 2008;23(6):826-36
47. Walter C, Al-Nawas B, Grötz KA, Thomas C, Thüroff JW, Zinser V et al. Prevalence and risk factors of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in prostate cancer patients with advanced disease treated with zoledronate. *Eur Urol.* 2008;54(5):1066-72
48. Katz J, Gong Y, Salmasinia D, Hou W, Burkley B, Ferreira P et al. Genetic polymorphisms and other risk factors associated with bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaw. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011;40(6):605-11
49. Nicoletti P, Cartsos VM, Palaska PK, Shen Y, Floratos A, Zavras AI. Genomewide pharmacogenetics of bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: the role of RBMS3. *Oncologist.* 2012;17(2):279-87
50. Marini F, Tonelli P, Cavalli L, Cavalli T, Masi L, Falchetti A et al. Pharmacogenetics of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *Front Biosci (Elite Ed).* 2011;3:364-70
51. Shintani T, Hayashido Y, Mukasa H, Akagi E, Hoshino M, Ishida Y et al. Comparison of the prognosis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw caused by oral and intravenous bisphosphonates. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44(7):840-4
52. Mashiba T, Mori S, Burr DB, Komatsubara S, Cao Y, Manabe T et al. The effects of suppressed bone remodeling by bisphosphonates on microdamage accumulation and degree of mineralization in the cortical bone of dog rib. *J Bone Miner Metab.* 2005;23(Suppl):36-42.
53. Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR. Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med.* 2006;144(10):753-61
54. Van den Wyngaert, T, Huizing MT, Vermoken JB. Osteonecrosis of the jaw related to the use of bisphosphonates. *Curr Opin Oncol.* 2007;19(4):315-22
55. Kobayashi, Y, Hiraga T, Ueda A, Wang L, Matsumoto-Nakano M, Hata K et al. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of

- oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. *J Bone Miner Metab.* 2010;28(2):165-75
56. Hansen, T., M. Kunkel, Weber A, James Kirkpatrick C. Osteonecrosis of the jaws in patients treated with bisphosphonates - histomorphologic analysis in comparison with infected osteoradionecrosis. *J Oral Pathol Med.* 2006;35(3):155-60
 57. Sedghizadeh PP, Kumar SK, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW. Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(4):767-75
 58. Yamagishi S, Abe R, Inagaki Y, Nakamura K, Sugawara H, Inokuma D. Minodronate, a newly developed nitrogen-containing bisphosphonate, suppresses melanoma growth and improves survival in nude mice by blocking vascular endothelial growth factor signaling. *Am J Pathol.* 2004;165(6):1865-74
 59. Fournier P, Boissier S, Filleur S, Guglielmi J, Cabon F, Colombel M et al. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res.* 2002;62(22):6538-44
 60. Landesberg R, Cozin M, Cremers S, Woo V, Kousteni S, Sinha S. Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(5):839-47
 61. Hikita H, Miyazawa K, Tabuchi M, Kimura M, Goto S. Bisphosphonate administration prior to tooth extraction delays initial healing of the extraction socket in rats. *J Bone Miner Metab.* 2009;27(6):663-72
 62. Reid IR, Bolland MJ, Grey AB. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone.* 2007;41(3):318-20
 63. Zandi M, Dehghan A, Janbaz P, Malekzadeh H, Amini P. The starting point for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: Alveolar bone or oral mucosa? A randomized, controlled experimental study. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017;45(1):157-161
 64. Senel FC, Kadioglu Duman M, Muci E, Cankaya M, Pampu AA, Ersoz S et al. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(3):385-91
 65. Gosain A, DiPietro LA. Aging and wound healing. *World J Surg* 2004;28(3):321-26

66. Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing (retraction of Witte M., Barbul A. In: Surg Clin North Am 1997; 77:509-528). *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(7 Suppl):12S-34S
67. Campos AC, Groth AK, Branco AB. Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008;11(3):281-8
68. Guo S, DiPietro LA. Factors Affecting Wound Healing, *J dent res.* 2010;89(3):219-29
69. Lodi G, Sardella A, Salis A, Demarosi F, Tarozzi M, Carrassi A. Tooth Extraction in Patients Taking Intravenous Bisphosphonates: A Preventive Protocol and Case Series. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(1):107-10
70. Ferlito S, Puzzo S, Liardo C. Preventive Protocol for Tooth Extractions in Patients Treated With Zoledronate: A Case Series. *J Oral Maxillofac Surg* 2011;69(6):e1-4
71. Ristow O, Otto S, Troeltzsch M, Hohlweg-Majert B, Pautke C. Treatment perspectives for medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). *J Craniomaxillofac Surg.* 2015;43(2):290-3
72. Shintania T, Miyauchi M, Tani R, Yoshioka Y, Akagi E, Toratani S et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw successfully treated with surgical resection and its histopathological features: A long-term follow-up report. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol.* 2015;27(2):283–6
73. Otto S, Ristow O, Pache C, Troeltzsch M, Fliefel R, Ehrenfeld M et al. Fluorescence-guided surgery for the treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw: A prospective cohort study. *J Craniomaxillofac Surg.* 2016;44(8):1073-80
74. Pautke C¹, Bauer F, Bissinger O, Tischer T, Kreutzer K, Steiner T et al. Tetracycline Bone Fluorescence: A Valuable Marker for Osteonecrosis Characterization and Therapy. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(1):125-9
75. Reid IR, Bolland MJ, Grey AB. Is bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw caused by soft-tissue toxicity? *Bone.* 2007;41(3):318-20
76. Ravosa MJ, Ning J, Liu Y, Stack MS. Bisphosphonate effects on the behavior of oral epithelial cells and oral fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 2011;56(5):491-8
77. Açıl Y, Möller B, Niehoff P, Rachko K, Gassling V, Wiltfang J et al. The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in-vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;40(8):e229-35
78. Scheper MA, Badros A, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF. Effect of Zoledronic Acid on Oral Fibroblasts and Epithelial Cells: A Potential Mechanism of Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis. *Br J Haematol.* 2009;144(5):667-6

79. Basso FG, Pansani TN, de Oliveira CF, Turrioni AP, Soares DG, Hebling J et al. Cytotoxic Effects of Zoledronic Acid on Human Epithelial Cells and Gingival Fibroblasts. *Braz Dent J.* 2013;24(6):551-8
80. Tanaka Y, Nagai Y, Dohdoh M, Oizumi T, Ohki A, Kuroishi T et al. In vitro cytotoxicity of zoledronate (nitrogen-containing bisphosphonate: NBP) and/or etidronate (non-BP) in tumour cells and periodontal cells. *Arch Oral Biol.* 2013;58(6):628-37
81. Nagaoka Y, Kajiya H, Ozeki S, Ikebe T, Okabe K. Mevalonates Restore Zoledronic Acid-induced Osteoclastogenesis Inhibition. *J Dent Res.* 2015;94(4):594-601
82. Landesberg R, Cozin M, Cremers S, Woo V, Kousteni S, Sinha S et al. Inhibition of Oral Mucosal Cell Wound Healing by Bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(5):839-47
83. Tipton DA, Seshul BA, Dabbous MKh. Effects of bisphosphonates on human gingival fibroblast production of mediators of osteoclastogenesis: RANKL, osteoprotegerin and interleukin-6. *J Periodont Res* 2011,46(1):39-47
84. Katsarelis H, Shah NP, Dhariwal DK, Pazianas M. Infection and Medication-related Osteonecrosis of the Jaw. *J Dent Res.* 2015;94(4):534-9
85. Lesclous P, Abi Najm S, Carrel JP, Baroukh B, Lombardi T, Willi JP et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: A key role of inflammation? *Bone.* 2009;45(5):843–52
86. Mawardi H, Giro G, Kajiya M, Ohta K, Almazrooa S, Alshwaimi E et al. A Role of Oral Bacteria in Bisphosphonate-induced Osteonecrosis of the Jaw. *J Dent Res.* 2011;90(11):1339-45
87. Draenert GF, Huetzen DO, Kämmerer PW, Palarie V, Nacu V, Wagner W. Dexrazoxane shows cytoprotective effects in zoledronic acid-treated human cells in vitro and in the rabbit tibia model in vivo. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012;40(8):e369-74
88. Cozin M, Pinker BM, Solemani K, Zuniga JM, Dadaian SC, Cremers S. Novel Therapy To Reverse The Cellular Effects of Bisphosphonates on Primary Human Oral Fibroblasts. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011;69(10):2564-78
89. Pabst AM, Krüger M, Ziebart T, Jacobs C, Sagheb K, Walter C. The influence of geranylgeraniol on human oral keratinocytes after bisphosphonate treatment: An in vitro study. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015;43(5):688-95

90. Ziebart T, Koch F, Klein MO, Guth J, Adler J, Pabst A, et al. Geranylgeraniol – A new potential therapeutic approach to bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw. *Oral Oncology*. 2011;47(3):195-201
91. Sonis ST, Watkins BA, Lyng GD, Lerman MA, Anderson KC. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. *Oral Oncol*. 2009;45(2):164-72
92. Huja SS, Fernandez SA, Phillips C, Li Y. Zoledronic acid decreases bone formation without causing osteocyte death in mice. *Arch Oral Biol*. 2009;54(9):851-6
93. Bi Y, Gao Y, Ehrchiou D, Cao C, Kikuri T, Le A et al. Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *Am J Pathol*. 2010;177(1):280-290
94. Biasotto M, Chiandussi S, Zacchigna S, Moimas S, Dore F, Pozzato G et al. A novel animal model to study non-spontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. *J Oral Pathol Med*. 2010;39(5):390-6
95. Hokugo A, Christensen R, Chung EM, Sung EC, Felsenfeld AL, Sayre JW et al. Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats. *J Bone Miner Res*. 2010;25(6):1337-49
96. López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Molina-Miñano F, Gómez-García F, Vicente-Ortega V. An experimental study of bisphosphonate-induced jaws osteonecrosis in SpragueDawley rats. *J Oral Pathol Med*. 2010;39(9):697-702
97. Aguirre J, Altman M, Vanegas S, Franz S, Bassit A, Wronski T. Effects of alendronate on bone healing after tooth extraction in rats. *Oral Dis*. 2010;16(7):674-85
98. Maahs MP, Azambuja AA, Campos MM, Salum FG, Cherubini K. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. *Head Neck*. 2011;33(2):199-207
99. Cankaya AB, Erdem MA, Isler SC, Demircan S, Soluk M, Kasapoglu C et al. Use of cone-beam computerized tomography for evaluation of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in an experimental rat model. *Int J Med Sci*. 2011;8(8):667-72
100. Aghaloo TL, Kang B, Sung EC, Shoff M, Ronconi M, Gotcher JE et al. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res*. 2011;26(8):1871-82
101. Marino KL, Zakhary I, Abdelsayed RA, Carter JA, O'Neill JC, Khashaba RM et al. Development of a rat model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *J Oral Implantol*. 2012;38(Spec. No.):511-8

102. Aguirre JI, Akhter MP, Kimmel DB, Pingel JE, Williams A, Jorgensen M et al. Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. *J Bone Miner Res.* 2012;27(10):2130-2143
103. Abtahi J, Agholme F, Sandberg O, Aspenberg P. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw in a rat model arises first after the bone has become exposed. No primary necrosis in unexposed bone. *J Oral Pathol Med.* 2012;41(6):494-9
104. Conte Neto N, Spolidorio LC, Andrade CR, S. Bastos A, Guimarães M, Marcantonio E. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. *Int J Exp Pathol.* 2013;94(1):65-73
105. Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo de Vera JL, García-Arranz M, Yébenes L, Burgueño M. Zoledronic acid - related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014;42(6):744-50
106. De Molon RS, Cheong S, Bezouglaia O, Dry SM, Pirih F, Cirelli JA et al. Spontaneous osteonecrosis of the jaws in the maxilla of mice on antiresorptive treatment: A novel ONJ mouse model. *Bone.* 2014;68:11–9
107. Silva PG, Ferreira Junior AE, Teófilo CR, Barbosa MC, Lima Júnior RC, Sousa FB et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Arch Oral Biol.* 2015;60(9):1237-45
108. Jang HW, Kim JW, Cha IH. Development of animal model for Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Maxillofac Plast Reconstr Surg.* 2015;37(1):18
109. Yang H, Pan H, Yu F, Chen K, Shang G, Xu Y. A novel model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rats. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(5):5161-7
110. Zandi M, Dehghan A, Malekzadeh H, Janbaz P, Ghadermazi K, Amini P. Introducing a protocol to create bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rat animal model. *J Craniomaxillofac Surg.* 2016;44(3):271-8
111. Córdova LA, Guilbaud F, Amiaud J, Battaglia S, Charrier C, Lezot F et al. Severe compromise of preosteoblasts in a surgical mouse model of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *J Craniomaxillofac Surg.* 2016;44(9):1387-94
112. De Molon RS, Shimamoto H, Bezouglaia O, Pirih FQ, Dry SM, Kostenuik P et al. OPG-Fc but Not Zoledronic Acid Discontinuation Reverses Osteonecrosis of the Jaws (ONJ) in Mice. *J Bone Miner Res.* 2015;30(9):1627–40
113. Cell Proliferation Kit I (MTT) pdf brochure, Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Version 17, September 2005

114. Walter C, Klein MO, Pabst A, Al-Nawas B, Duschner H, Ziebart T. Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells. *Clin Oral Investig.* 2010;14(1):35-41
115. Simon MJ, Niehoff P, Kimmig B, Wiltfang J, Açil Y. Expression profile and synthesis of different collagen types I, II, III, and V of human gingival fibroblasts, osteoblasts, and SaOS-2 cells after bisphosphonate treatment. *Clin Oral Investig.* 2010;14(1):51-8
116. Migliorati CA, Siegel MA, Elting LS. Bisphosphonate-associated osteonecrosis: a long-term complication of bisphosphonate treatment. *Lancet Oncol.* 2006;7(6):508-14
117. Crick DC, Andres DA, Waechter CJ. Novel salvage pathway utilizing farnesol and geranylgeraniol for protein isoprenylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;237(3):483-7
118. Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, Luckman SP, Hughes DE, Masarachia PJ et al. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(1):133–8
119. Chen T, Berenson J, Vescio R, Swift R, Gilchick A, Goodin S et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. *J Clin Pharmacol.* 2002;42(11):1228-36
120. Saracino S, Canuto RA, Maggiora M, Oraldi M, Scoletta M, Ciuffreda L et al. Exposing human epithelial cells to zoledronic acid can mediate osteonecrosis of jaw: an in vitro model. *J Oral Pathol Med.* 2012;41(10):788-92
121. Mozzati M, Martinasso G, Maggiora M, Scoletta M, Zambelli M, Carossa S et al. Oral mucosa produces cytokines and factors influencing osteoclast activity and endothelial cell proliferation, in patients with osteonecrosis of jaw after treatment with zoledronic acid. *Clin Oral Investig.* 2013;17(4):1259-66