

ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΑΚΟΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΤΗΝ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗ ΕΠΙΣΤΗΜΗ

***Εκ νίνο μελέτη των κυτταρικών αποκρίσεων του  
ανθρώπινου πολφού σε συγκολλητικούς  
παράγοντες κατά τα πρώιμα στάδια της  
διεργασίας επούλωσης***

ANNA ΠΟΙΜΕΝΟΒΑ

ΑΘΗΝΑ 2018

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Επιβλέπουσα: Ε. Κιτράκη, Καθηγήτρια

Μέλη: Χ. Ραχιώτης, Επίκουρος Καθηγητής

Ν. Κερεζούδης, Αναπληρωτής Καθηγητής

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Επιβλέπουσα: Ε. Κιτράκη, Καθηγήτρια

Μέλη: Χ. Ραχιώτης, Επίκουρος Καθηγητής

Ν. Κερεζούδης, Αναπληρωτής Καθηγητής

Α. Κακάμπουρα, Καθηγήτρια

Γ. Ηλιάδης, Καθηγητής

Π. Πανόπουλος, Καθηγητής

Ι. Τζούτζας, Καθηγητής

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Οδοντιατρικής του Ε.Κ.Π.Α., δεν υποδηλώνει ότι αποδέχεται τη γνώμη του συγγραφέα.

Οργανισμός Πανεπιστημίου Αθηνών, Άρθρο 202, παρ. 2, Ν.5343/1932

<b>Περιεχόμενα</b>	
<b>Πρόλογος</b>	5
A. Γενικό μέρος	8
<b>Εισαγωγή</b>	9
<b>1. Δομή του συμπλέγματος οδοντίνης-πολφού</b>	13
1.1 Οδοντίνη	13
1.1.2 Τύποι οδοντίνης	13
1.2 Πολφός	16
1.2.1 Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία του πολφού	16
1.2.2 Κύτταρα πολφού	18
1.2.2.1 Οδοντινοβλάστες	18
1.2.2.2 Άλλα κύτταρα του πολφού	19
1.2.2.3 Βασικές ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες - Βιμεντίνη	21
<b>2. Επίδραση υλικών κάλυψης στο σύμπλεγμα οδοντίνης-πολφού</b>	23
2.1 Επίδραση του Ca(OH) <sub>2</sub> στο σύμπλεγμα οδοντίνης-πολφού	24
2.2 Επίδραση των συγκολλητικών συστημάτων στο σύμπλεγμα οδοντίνης-πολφού	27
2.2.1 Κυτταροτοξικότητα των συγκολλητικών συστημάτων	28
2.2.2 Κυτταροτοξικότητα συγκολλητικών παραγόντων και οξειδωτικό στρες	31
2.2.3 Κλινικές μελέτες άμεσης κάλυψης του πολφού	35
<b>3. Στρες του ενδοπλασματικού δικτύου</b>	36
3.1 Ποιοτικός Έλεγχος και αναδίπλωση πρωτεϊνών στο ΕΔ	39
3.2 Η απάντηση του ΕΔ στη λανθασμένη αναδίπλωση πρωτεϊνών – Unfolded Protein Response, UPR	39
3.3 Η πρωτεΐνη ERdj5	42
3.4 Απόπτωση σχετιζόμενη με το στρες του ΕΔ	44

<b>4. Δομή και ρόλος του TGFβ στο σύμπλεγμα οδοντίνης-πολφού</b>	47
4.1 Δομή και έκκριση του TGFβ	48
4.2 Υποδοχείς του TGFβ	49
4.3 Σηματοδότηση του TGFβ - παράγοντες SMAD	50
4.4 Ο ρόλος του TGFβ στο σύμπλεγμα πολφού-οδοντίνης	52
<b>B. Ειδικό μέρος</b>	58
Σκοπός	59
Υλικά και Μεθοδολογία	59
<i>Συλλογή δειγμάτων</i>	59
<i>Καλλιέργεια ιστών</i>	60
<i>Χρώση MTT</i>	63
<i>Επεξεργασία ιστών</i>	63
<i>Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης</i>	64
<i>Μέθοδος TUNEL</i>	64
<i>Ανοσοϊστοχημεία</i>	65
<i>Στατιστική ανάλυση</i>	69
<i>Αποτελέσματα</i>	69
<i>Επίδραση στη ζωτικότητα των κυττάρων, την ακεραιότητα του ιστού και την απόπτωση</i>	69
<i>Επίδραση στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) και τον αυξητικό παράγοντα TGFβ2</i>	80
<i>Συζήτηση</i>	87
<i>Συμπεράσματα</i>	96
<i>Δελτίο συγκατάθεσης για συμμετοχή σε έρευνα</i>	97
<i>Περίληψη</i>	102
<i>Abstract</i>	104
<i>Βιβλιογραφία</i>	108

## Πρόλογος

Η μελέτη σε μοριακό επίπεδο της αναγεννητικής ικανότητας ιστών και οργάνων έχει έρθει τα τελευταία χρόνια στο προσκήνιο των ερευνών και ανοίγει νέες θεραπευτικές προοπτικές. Πολλά βήματα έχουν γίνει ήδη στο πεδίο της κατανόησης των πολύπλοκων και λεπτά ρυθμιζόμενων μοριακών μηχανισμών, τόσο των φυσιολογικών όσο και εκείνων που διέπουν τις διαδικασίες επούλωσης των ιστών. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη ραγδαία ανάπτυξη βιολικών, έχει οδηγήσει σε αναθεώρηση πολλών από τις παλιές μεθόδων αποκατάστασης ιστικών βλαβών.

Η οδοντιατρική επιστήμη ακολουθώντας κατά πόδας τις εξελίξεις στον τομέα της μοριακής βιολογίας και των βιολικών, εστιάζει, ανάμεσα στα άλλα, το ενδιαφέρον της στη μελέτη των μηχανισμών επούλωσης του συμπλέγματος οδοντίνης-πολφού προκειμένου να μπορέσει να χρησιμοποιήσει τη γνώση αυτή στη θεραπεία του ζωντανού πολφού. Πολλοί από τους επανορθωτικούς μηχανισμούς που ενεργοποιούνται στο σύμπλεγμα οδοντίνης-πολφού μετά από την προσβολή του (π.χ. τερηδόνα που οδηγεί στην αποκάλυψη του πολφού ή εφαρμογή υλικών άμεσα ή έμμεσα στον πολφό) δεν έχουν διαλευκανθεί έως σήμερα, αν και έχει φανεί ότι παρουσιάζουν εξαιρετική ομοιότητα με τους πρώιμους μηχανισμούς ανάπτυξης του συμπλέγματος. Αυξητικοί παράγοντες και παράγοντες μεταγραφής, τα αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα αλλά και οι μηχανισμοί διόρθωσης των κυτταρικών βλαβών, που παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την ανάπτυξη, φαίνεται να ενεργοποιούνται και κατά την επούλωση του ιστού. Η ερευνητική προσπάθεια επομένως στρέφεται προς την κατανόηση όλων αυτών των φαινομένων προκειμένου να γίνει εφικτή η αξιοποίησή τους στη θεραπεία ζωντανού πολφού.

Παράλληλα, μελέτες βιοσυμβατότητας των υλικών αναθεωρούν τα υλικά που παραδοσιακά χρησιμοποιούνταν στη θεραπεία ζωντανού πολφού, όπως το  $\text{Ca(OH)}_2$ . Ελέγχουν επίσης την αποτελεσματικότητα των υλικών, που έχουν μεν καθιερωθεί στην επανορθωτική οδοντιατρική αλλά η εφαρμογή τους απευθείας στον πολφό να μην είναι τεκμηριωμένη, όπως στην περίπτωση συγκολλητικών συστημάτων συνθέτων ρητινών. Τέλος δοκιμάζουν νέους παράγοντες, όπως π.χ. τους αυξητικούς

παράγοντες, που θα μπορούσαν να ενεργοποιήσουν τους ήδη υπάρχοντες εγγενείς αναγεννητικούς μηχανισμούς του πλφού.

Στην παρούσα μελέτη γίνεται μια προσπάθεια να διαλευκανθεί η επίπτωση της εφαρμογής άμεσα στον πλφό τριών διαφορετικών συγκολλητικών συστημάτων και του  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ως προς τη διατήρηση της ζωτικότητας του ιστού και τις πρώιμες κυτταρικές αποκρίσεις του πλφού στον έλεγχο του κυτταρικού στρες και της ιστικής αναγέννησης.

Η έρευνα που αναπτύσσεται αναλυτικά στο ειδικό μέρος της διατριβής πραγματοποιήθηκε στα παρακάτω εργαστήρια:

- Εργαστήριο Βασικών Ιατροβιολογικών Επιστημών, Τομέας Βασικών Επιστημών και Βιολογίας Στόματος, Οδοντιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών
  - Εργαστήριο Βιοϋλικών, Τομέας Βασικών Επιστημών και Βιολογίας Στόματος, Οδοντιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών
  - Εργαστήριο Περιοδοντολογίας, Τομέας Οδοντικής Παθολογίας και Θεραπευτικής, Οδοντιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών
- Επιμέρους τεχνική υποστήριξη παρείχαν τα:
- Εργαστήριο Βιολογίας-Βιοχημείας, Τομέας Βασικών Επιστημών, Τμήμα Νοσηλευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας Πανεπιστημίου Αθηνών (υπεύθυνος Α. Σταματάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας-Βιολογίας Συμπεριφοράς)
  - Κλινική Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής, Τομέας Παθολογίας και Χειρουργικής Στόματος, Οδοντιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών
  - Εργαστήριο Στοματολογίας, Τομέας Παθολογίας και Χειρουργικής Στόματος, Οδοντιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους υπεύθυνους και το προσωπικό όλων των παραπάνω εργαστηρίων για τη βοήθειά τους στην πραγματοποίηση της παρούσας έρευνας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Ε. Κιτράκη, επιβλέπουσα Καθηγήτρια και υπεύθυνη του Εργαστηρίου Βασικών Ιατροβιολογικών Επιστημών, για την ουσιαστική συμβολή της σε όλα τα στάδια της μελέτης και της δημοσίευσης αυτής, καθώς και για το δημιουργικό περιβάλλον του εργαστηρίου, μέσα στο οποίο πραγματοποιήθηκε και το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας. Ευχαριστώ επίσης τον κ. Χ. Ραχιώτη, Επίκουρο Καθηγητή στο εργαστήριο Οδοντικής Χειρουργικής και μέλος

της τριμελούς επιτροπής, για την αρχική ιδέα της μελέτης και τις συμβουλές του όλα αυτά τα χρόνια. Την κα Α. Κακάμπουρα, Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Οδοντικής Χειρουργικής, που βοήθησε να λυθούν άμεσα και γρήγορα πολλά από τα οικονομικά και τα πρακτικά ζητήματα που αφορούσαν τη μελέτη, ενώ συνέβαλε ουσιαστικά και στη δημοσίευσή της. Τις ευχαριστίες μου εκφράζω επίσης στον κ. Ν. Κερεζούδη, Επίκουρο Καθηγητή στο Εργαστήριο Ενδοδοντίας, και μέλος της τριμελούς επιτροπής, για τις χρήσιμες παρατηρήσεις του, αλλά και στον κ. Α. Σταματάκη, Αναπληρωτή Καθηγητή στο τμήμα Νοσηλευτικής, για τις χρήσιμες συμβουλές και τον χρόνο του, καθώς και για την παροχή υποδομών του Εργαστηρίου του, προκειμένου να προχωρήσει η εκπόνηση της διατριβής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Δρ Κ. Κυριακίδου, υπεύθυνη στο χώρο της κυτταροκαλλιέργειας, για την παρουσία και την τεχνική βοήθειά της, καθώς και την κα Μ. Μάνου, Τεχνολόγο στο Εργαστήριο Στοματολογίας για τη δική της ιδιαίτερη βοήθεια και συμβολή στην εκπόνηση της μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κ. Μασούρα και την κα Ι. Αρτοπούλου, Λέκτορες στα Εργαστήρια Οδοντικής Χειρουργικής και Προσθητικής αντίστοιχα, καθώς και τον κ. Η. van Versendaal, για τη βοήθειά τους στη διόρθωση του αγγλικού κειμένου του προς δημοσίευση άρθρου. Τέλος, μέσα από την καρδιά μου ευχαριστώ όλους τους φίλους μου και τους συνεργάτες με τους οποίους μπορούσα να μοιραστώ τους προβληματισμούς και της ανησυχίας μου και που με στήριξαν, ο καθένας με το δικό του τρόπο, όλα αυτά τα χρόνια.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ), υπότροφος του οποίου έχω την τιμή να είμαι, για την οικονομική βοήθεια που μου προσέφερε μέσω της χορήγησης της υποτροφίας για την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής.

Η έρευνα που αναπτύσσεται στην παρούσα διατριβή συγχρηματοδοτήθηκε από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών και από το Εργαστήριο Οδοντικής Χειρουργικής της Οδοντιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

## **A. Γενικό μέρος**



## Εισαγωγή

Το σύμπλοκο οδοντίνης-πολφού αποτελεί ένα εξαιρετικά πολύπλοκο σύστημα τόσο από την άποψη της δομής όσο και από την άποψη της λειτουργίας. Πρόκειται για δύο ιστούς, πολύ διαφορετικούς μεταξύ τους, οι οποίοι ωστόσο έχουν κοινή εμβρυολογική προέλευση και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (Goldberg & Smith, 2004). Τόσο η ανάπτυξη όσο και η λειτουργία του συμπλόκου οδοντίνης-πολφού υπόκεινται σε ένα πολύπλοκο λεπτό ρυθμιστικό μηχανισμό βασιζόμενο σε πληθώρα μορίων. Εξίσου πολύπλοκοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί συμμετέχουν στη διαδικασία επούλωσης του συμπλέγματος οδοντίνης-πολφού. Οι μοριακοί αυτοί μηχανισμοί παραμένουν έως σήμερα αδιευκρίνιστοι σε ένα μεγάλο βαθμό, ενώ τα τελευταία χρόνια γίνεται συστηματική προσπάθεια να διερευνηθούν προκειμένου να μπορούν να αξιοποιηθούν στη θεραπεία ζωντανού πολφού.

Έως σήμερα για τη θεραπεία ζωντανού πολφού, όπως είναι η περίπτωση άμεσης και έμμεσης κάλυψης του πολφού, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα υλικά με επικρατέστερο το  $\text{Ca(OH)}_2$ . Πρόκειται για ένα υλικό με μακροχρόνια ερευνητική και κλινική υποστήριξη, το οποίο αποτελεί έως και σήμερα υλικό αναφοράς στις μελέτες της θεραπείας ζωντανού πολφού. Παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα (αντιμικροβιακή δράση, χαμηλή κυτταροτοξικότητα, επαγωγή σχηματισμού γέφυρας οδοντίνης), ενώ δε στερείται και μειονεκτημάτων (μεγάλη διαλυτότητα, χαμηλές χημικομηχανικές ιδιότητες) (Kitasako et al, 2000; Schuur et al, 2000). Το γεγονός αυτό οδήγησε τους ερευνητές στην αναζήτηση νέων υλικών κάλυψης του πολφού ανάμεσα στους οποίους είναι και τα συγκολλητικά συστήματα συνθέτων ρητινών (Komabayashi et al, 2016; Liebenberg, 1999). Τα τελευταία χρόνια, διάφορες κατηγορίες συγκολλητικών συστημάτων άρχισαν να δοκιμάζονται στα πλαίσια της συνολικής κατεύθυνσης της αποκαταστατικής οδοντιατρικής προς τις συγκολλητικές τεχνικές, αλλά και ως υλικά που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στη διαμόρφωση μιας πιο απλοποιημένης και με λιγότερα στάδια τεχνικής κάλυψης του πολφού. Οι έρευνες ωστόσο που μελέτησαν την κυτταροτοξικότητα των μονομερών των συγκολλητικών συστημάτων ανέδειξαν από πολύ νωρίς τις βλαπτικές επιδράσεις

αυτών στα κύτταρα του πολφού, χωρίς όμως τα αρνητικά αποτελέσματα να μπορούν να επιβεβαιωθούν με σαφήνεια και από τις κλινικές έρευνες που ακολούθησαν (Hanks et al, 1991; Kraus et al, 2017; Pereira et al, 2000). Λιγότερες ακόμα έρευνες, και με ακόμα πιο ασαφή αποτελέσματα, μελέτησαν την επίδραση στον πολφό ολοκληρωμένων συγκολλητικών συστημάτων και όχι μόνο μεμονωμένων μονομερών τους.

Πλέον οι έρευνες στρέφονται όχι μόνο στην αναζήτηση νέων υλικών κάλυψης του πολφού αλλά περισσότερο στην αναζήτηση νέων μεθόδων αξιοποίησης του ίδιου του δυναμικού του πολφού για επούλωση. Πρόκειται για την απομόνωση και την αξιοποίηση βλαστικών κυττάρων και αυξητικών παραγόντων που θα μπορούσαν να προάγουν την επούλωση με βάση τους εγγενείς ρυθμιστικούς μηχανισμούς του πολφού (Abou Neel et al, 2014).

Προς την κατεύθυνση αυτή έχουν μελετηθεί αυξητικοί παράγοντες όπως ο TGFβ, οι BMPs κ.α. Φαίνεται ότι η εφαρμογή τους στον πολφό επάγει ορισμένους μηχανισμούς επούλωσης. Ταυτόχρονα μελετάται και η δυνατότητα της απελευθέρωσής τους από την οδοντίνη και τον πολφό, όπου βρίσκονται σε λανθάνουσα μορφή, και της ενεργοποίησής τους στον πολφό, και πάλι προς την κατεύθυνση της επούλωσης (Zhao et al, 2000; Graham et al, 2006).

Παράλληλα με τις μελέτες των ρυθμιστικών μηχανισμών της λειτουργίας και της επούλωσης του πολφού, έρευνες εστιάζουν όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον τους στη διερεύνηση του μηχανισμού παραγωγής από τα ρητινώδη μονομερή ελευθέρων ριζών και του προκαλούμενου κυτταρικού στρες, καθώς έχει αναγνωριστεί ο καθοριστικός ρόλος του στη στην επουλωτική ικανότητα του ιστού.

Και πάλι όμως απαιτούνται έρευνες που θα μελετήσουν την επίδραση πιο ολοκληρωμένων συγκολλητικών συστημάτων και όχι μεμονωμένων συστατικών τους, και μάλιστα όχι σε κύτταρα, αλλά σε ολόκληρο το σύμπλεγμα οδοντίνης-πολφού, σε συνθήκες δηλαδή που πλησιάζουν περισσότερο την κλινική πραγματικότητα.

Οι μελέτες επίδρασης διαφόρων παραγόντων σε ολόκληρο το σύμπλοκο οδοντίνης-πολφού του ανθρώπου πραγματοποιούνται ήδη σε *ex vivo* συστήματα με

τη χρησιμοποίηση είτε ολόκληρων δοντιών, είτε τεμαχιδίων ανθρώπινων δοντιών σε καλλιέργεια. Οι προσεγγίσεις αυτές, προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις *in vitro* μελέτες (σε τυπικές κυτταροκαλλιέργειες), όπως είναι η διατήρηση της ιστικής ακεραιότητας και του νευρο-αγγειακού συστήματος του πολφού. Προσομοιάζουν έτσι περισσότερο την *in vivo* κατάσταση έκθεσης του ανθρώπινου πολφού, ενώ ταυτόχρονα, και είναι πιο ευέλικτες συγκριτικά με τις *in vivo* μελέτες σε ανθρώπους από απόψεως δεοντολογίας. Ένα *ex vivo* σύστημα που προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Magloire και συν (Magloire et al, 1996) χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Στο γενικό μέρος αυτής της διατριβής αναπτύσσονται αναλυτικά τα δεδομένα που υπάρχουν στη σύγχρονη βιβλιογραφία σχετικά με όλα τα προαναφερθέντα ζητήματα. Συγκεκριμένα αναπτύσσονται η δομή και η λειτουργία του συμπλέγματος οδοντίνης-πολφού, η επίδραση στο σύμπλεγμα οδοντίνης-πολφού διαφόρων παραγόντων κάλυψης πολφού, όπως το  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  και οι συγκολλητικοί παράγοντες, η κυτταροτοξικότητα συγκολλητών συστημάτων σε σχέση με το κυτταρικό στρες, την απόπτωση και τη δράση αυξητικών παραγόντων, όπως ο TGFβ στο σύμπλεγμα οδοντίνης-πολφού.

Στο ειδικό μέρος μελετάται σε ένα *ex vivo* σύστημα η πρώιμη αντίδραση του ανθρώπινου πολφού στην άμεση κάλυψή του με  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  και με τρία διαφορετικά συγκολλητικά συστήματα συνθέτων ρητινών. Οι πολφικές αποκρίσεις που εξετάστηκαν αφορούσαν στη ζωτικότητα, στο βαθμό απόπτωσης των κυττάρων του πολφού και στην ικανότητα ιστικής επούλωσης. Παράλληλα, εξετάστηκε η ιστική ακεραιότητα και η έκφραση πρωτεϊνών που συνδέονται με το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου.

Στα πλαίσια της διατριβής αυτής πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω δημοσιεύσεις:

1. Poimenova A, Kitraki E, Kakaboura A, Rahiotis C. Early responses of human pulp to direct capping with resin adhesive systems and calcium hydroxide. *Dent Mater* 2018 Feb 2. pii: S0109-5641(17)31107-7. doi: 10.1016/j.dental.2018.01.018.
2. Ποιμένοβα Άννα. Άμεση κάλυψη του πολφού με συγκολλητικά συστήματα συνθέτων ρητινών: βιβλιογραφική ανασκόπηση. *Οδοντοστοματολογική Πρόοδος* 2017;71:60-73.

## **1. Δομή του συμπλέγματος οδοντίνης-πολφού**

Η οδοντίνη και ο πολφός του δοντιού είναι δύο ιστοί που έχουν κοινή εμβρυολογική προέλευση, ενώ από πλευράς ανάπτυξης, δομής και λειτουργίας αποτελούν ένα αδιαχώριστο σύμπλεγμα ιστών που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (Goldberg & Smith, 2004). Τόσο η οδοντίνη όσο και ο πολφός είναι ιστοί μεσεγχυματικής προέλευσης. Η οδοντίνη προέρχεται από τις οδοντινοβλάστες, οι οποίες ανήκουν στον κυτταρικό πληθυσμό του πολφού. Από πλευράς δομής, πολφικά στοιχεία όπως οι αποφυάδες των οδοντινοβλαστών, οι νευρικές απολήξεις και το οδοντινικό υγρό εκτείνονται και στην οδοντίνη. Από λειτουργικής άποψης, ερεθίσματα χημικά, θερμικά και μηχανικά, που επιδρούν στην οδοντίνη, προκαλούν αντιδράσεις στον πολφό.

### **1.1 Οδοντίνη**

#### **1.1.2 Τύποι οδοντίνης**

Η οδοντίνη είναι ιστός με πολύπλοκη δομή και παρουσιάζει ορισμένους μορφολογικά ευδιάκριτους τύπους. Ο συνηθέστερος τρόπος διάκρισης της οδοντίνης είναι ανάλογα με το χρόνο και το ερέθισμα που προκαλεί την παραγωγή της και διακρίνεται σε πρωτογενή, δευτερογενή και τριτογενή οδοντίνη. Πριν την ανατολή του δοντιού, κατά την οδοντινογένεση παράγεται, με γρήγορο ρυθμό, η πρωτογενής οδοντίνη. Αυτή αναφέρεται και ως περιπολφική, και αποτελεί το μεγαλύτερο τμήμα της οδοντίνης του δοντιού. Το μεγαλύτερο τμήμα της πρωτογενούς οδοντίνης βρίσκεται ανάμεσα στα οδοντινοσωληνάρια και αποτελεί την μεσοσωληναριακή οδοντίνη, ενώ ένα μικρότερο, περιβάλλει τα τοιχώματα των οδοντινοσωληναρίων, και αποτελεί την ενδοσωληναριακή οδοντίνη. Μετά την ανατολή του δοντιού αρχίζει η παραγωγή της δευτερογενούς οδοντίνης. Η δευτερογενής οδοντίνη αποτελεί τη φυσιολογική συνέχεια της πρωτογενούς και

παράγεται από τις ίδιες οδοντινοβλάστες, με βραδύτερο όμως ρυθμό, καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του δοντιού.

Η οδοντίνη αρχικά παράγεται από τις οδοντινοβλάστες ως πρωτεϊνικό υπόστρωμα, και ονομάζεται προ-οδοντίνη. Η προ-οδοντίνη είναι το μη μεταλλικοποιημένο οργανικό υπόστρωμα της οδοντίνης και τοπογραφικά βρίσκεται μεταξύ της ώριμης οδοντίνης και της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας στην περιφέρεια του πολφού. Έχει εύρος 10-30μm. Αποτελείται από την άμορφη θεμέλια ουσία, κυρίως πρωτεογλυκάνες, καθώς και από το δίκτυο κολλαγόνου (Goldberg et al, 2012). Η προ-οδοντίνη περικλείει στη μάζα της, όπως και η ενασβεστωμένη περιπολφική οδοντίνη, τα οδοντινοσωληνάκια με τις αποφυάδες των οδοντινοβλαστών. Κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης των οδοντινοβλαστών, στην περιοχή της προ-οδοντίνης, λαμβάνει χώρα η ανταλλαγή των προϊόντων μεταβολισμού μεταξύ των κυττάρων και της εξωκυττάριας μήτρας. Κατά τον σχηματισμό της οδοντίνης, η προ-οδοντίνη βαθμιαία μεταλλικοποιείται και μεταπίπτει σε ώριμη οδοντίνη.

Το χαρακτηριστικό μορφολογικό γνώρισμα της περιπολφικής οδοντίνης είναι τα οδοντινοσωληνάκια, τα οποία, στη μύλη του δοντιού εκτείνονται από την προ-οδοντίνη έως την αδαμαντινο-οδοντινική ένωση και στην περιοχή της ρίζας από την προ-οδοντίνη έως την οδοντινο-οστεϊνική ένωση. Τα οδοντινοσωληνάκια περικλείουν στη μάζα τους την αποφυάδα των οδοντινοβλαστών και τις νευρικές απολήξεις. Η διάμετρος των οδοντινοσωληναρίων είναι 2-4μm, ενώ η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται από 18.000 έως 21.000 οδοντινοσωληνάκια/mm<sup>2</sup> οδοντίνης, με μεγαλύτερη συγκέντρωση στο εσωτερικό της τριτημόριο (Schilke et al, 2000). Τα οδοντινοσωληνάκια στην οδοντίνη αναπαριστούν την πορεία των οδοντινοβλαστών από την περιφέρεια προς το κέντρο κατά τη διάρκεια της οδοντινογένεσης, ενώ ο συνωστισμός των κυττάρων εξηγεί την αύξηση της συγκέντρωσης των οδοντινοσωληναρίων στο εσωτερικό τριτημόριο. Τα οδοντινοσωληνάκια έχουν κυρίως κυματοειδή πορεία, η οποία είναι πιο έντονη στην περιοχή της μύλης του δοντιού. Παρουσιάζουν αναστομώσεις μέσω των οποίων επικοινωνούν μεταξύ τους. Οι αναστομώσεις είναι περισσότερο συχνές στην περιφέρεια της οδοντίνης,

λιγότερο στο μέσο τριτημόριο, και απουσιάζουν στο πολφικό τριτημόριο της οδοντίνης.

Μετά από επίδραση εξωτερικών ερεθισμάτων (θερμικών, χημικών, μηχανικών ή μικροβιακών παραγόντων) στον πολφό, οι οδοντινοβλάστες αντιδρούν και παράγουν οδοντίνη, σε μια προσπάθεια άμυνας του πολφού. Παρόμοια αντίδραση αναπτύσσουν και άωρα μεσεγχυματικά κύτταρα του πολφού, τα οποία διαφοροποιούνται σε κύτταρα δίκην-οδοντινοβλαστών. Η παραγωγή οδοντίνης υπό την επίδραση των ερεθισμάτων ονομάζεται τριτογενής οδοντίνη και μπορεί να διακριθεί σε αντιδραστική και επανορθωτική οδοντίνη (Kawasaki et al, 1977). Η αντιδραστική οδοντίνη σχηματίζεται κατόπιν επίδρασης ήπιου και συνήθως χρόνιου ερεθίσματος. Ο σχηματισμός της από ώριμες οδοντινοβλάστες υποδηλώνει ότι η κυτταρική και η λειτουργική διαφοροποίηση είναι δύο διαφορετικά γεγονότα. Αυτό σημαίνει ότι μετά την ολοκλήρωση της διαφοροποίησης της οδοντινοβλάστης, η λειτουργική της διαφοροποίηση μπορεί να σταματήσει ή να ενεργοποιηθεί, καθώς και να τροποποιηθεί με τη δράση σηματοδοτικών μορίων. Σηματοδοτικά μόρια που έπαιξαν ρόλο στην αρχική διαφοροποίηση κατά την παραγωγή της πρωτογενούς οδοντίνης φαίνεται να συμμετέχουν εκ νέου στη μετέπειτα ενεργοποίηση της οδοντινοβλάστης κάτω από την επίδραση των εξωτερικών ερεθισμάτων για την παραγωγή αντιδραστικής οδοντίνης.

Σε αντίθεση με την αντιδραστική οδοντίνη, η οποία αποτελεί μάλλον μια ομοιογενή ιστική αντίδραση, ο σχηματισμός επανορθωτικής οδοντίνης περιλαμβάνει μια ευρεία κλίμακα κυτταρικών αποκρίσεων. Η επανορθωτική οδοντίνη παράγεται από αδιαφοροποίητα πολφικά κύτταρα, τα οποία μετά από την επίδραση ενός συνήθως πιο ισχυρού εξωτερικού ερεθίσματος, διαφοροποιούνται σε κύτταρα δίκην-οδοντινοβλαστών ικανά να παράξουν οδοντίνη. Τα πρόδρομα αυτά κύτταρα, αποτελούν ένα σχετικά μικρό πληθυσμό μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων του πολφού. Η κυτταρική και λειτουργική διαφοροποίησή τους, τους επιτρέπει να ανταποκρίνονται σε επιγεννητικά ερεθίσματα, και να μεταναστεύουν στο σημείο της βλάβης με τη βοήθεια χημειοτακτικών παραγόντων (Ruch et al, 1995). Εκτός από τα αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα, την ίδια κατεύθυνση διαφοροποίησης

μπορούν να πάρουν και τα περιαγγειακά κύτταρα του πολφού, τα περικύτταρα (Shi & Gronthos, 2003; Fitzgerald et al, 1990), αν και κατά πόσο πραγματικά συμβαίνει αυτό έχει αμφισβητηθεί (Mina & Braut, 2004; Alliot-Licht et al, 2005).

## **1.2 Πολφός**

Ο πολφός του δοντιού είναι ένας αγγειοβριθής και νευροβριθής συνδετικός ιστός, ο οποίος περικλείεται στην πολφική κοιλότητα του δοντιού. Το χαρακτηριστικό ανατομικό στοιχείο του οδοντικού πολφού είναι ότι περικλείεται σε μία κλειστή κοιλότητα με ανένδοτα τοιχώματα, σχηματιζόμενα από προ-οδοντίνη και οδοντίνη. Η επικοινωνία του πολφού με το εξωτερικό περιβάλλον σε φυσιολογικές συνθήκες δεν υφίσταται χάρη στην ύπαρξη της συμπαγούς, μη διαπερατής αδαμαντίνης, αφού η οδοντίνη είναι διαπερατή σε χημικά και μικροβιακά ερεθίσματα, εξαιτίας της ύπαρξης των οδοντινοσωληναρίων. Η διατήρηση της ζωτικότητας του πολφού, συνεπώς, εξασφαλίζεται σχεδόν αποκλειστικά μέσω των αγγείων που εισέρχονται από το ακρορριζικό τρήμα και σε μικρότερο βαθμό μέσω των παράπλευρων ριζικών σωλήνων.

Ο πολφός αποτελείται από οργανικά συστατικά, σε ποσοστό 25% του βάρους του και από νερό, σε ποσοστό 75% του βάρους του. Τα βασικά δομικά συστατικά του πολφού είναι τα κύτταρα και η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, αποτελούμενη από κολλαγόνο, μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες, αγγεία και νεύρα.

### **1.2.1 Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία του πολφού**

Το κολλαγόνο που συναντάται στον πολφό αποτελεί το βασικό οργανικό συστατικό της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Το κολλαγόνου τύπου I αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του συνολικού κολλαγόνου (56%). Σχηματίζει πυκνές δεσμίδες σε όλη την έκταση του πολφού και συμβάλλει στη διατήρηση της αρχιτεκτονικής δομής του ιστού. Το κολλαγόνο τύπου III συμμετέχει επίσης σε υψηλό ποσοστό.



Υπολογίζεται ότι αποτελεί έως το 42,6% του συνολικού κολλαγόνου στον ανθρώπινο πολφό (Lechner & Kalnitsky, 1981). Στο μεγάλο ποσοστό του κολλαγόνου τύπου III αποδίδεται και η μεγάλη ελαστικότητα του πολφού, δεδομένου ότι το κολλαγόνο τύπου I σχηματίζει αρκετά άκαμπτες δομές. Το κολλαγόνο τύπου III σχηματίζει πιο λεπτές δεσμίδες σε σχέση με το κολλαγόνο τύπου I και είναι καλά κατανεμημένο σε όλη την έκταση του πολφού. Τέλος, στον πολφό συναντάται, σε μικρό ποσοστό, κολλαγόνο τύπου V και VI, το οποίο είναι κατανεμημένο στον πολφό σε πυκνό πλέγμα αποτελούμενο από λεπτά ινίδια, τα οποία φαίνεται να επεκτείνονται και στην προ-οδοντίνη (Hillmann & Geurtsen, 1997; Lukinmaa & Waltimo, 1992).

Εκτός από τις ίνες κολλαγόνου, στον πολφό υπάρχουν και ελαστικές ίνες, οι οποίες σχηματίζονται από δεσμίδες μικροϊνιδίων οξυταλάνης και μόρια ελαστίνης ανάμεσά τους. Τα μόρια ελαστίνης συνδεόμενα μεταξύ τους σχηματίζουν δομές, όμοιες με ελαστικό σπирάλ, που ανοίγει και κλείνει, προσδίδοντας στις δεσμίδες οξυταλάνης μεγάλη ελαστικότητα. Οι ελαστικές ίνες στον πολφό περιορίζονται μόνο στα τοιχώματα μεγάλων αιμοφόρων αγγείων και όχι ανάμεσα στις ίνες κολλαγόνου, όπου ανιχνεύεται το κολλαγόνο τύπου III (Magloire et al, 1982).

Οι γλυκοζαμινογλυκάνες και οι πρωτεογλυκάνες, ως μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες, αποτελούν επίσης συστατικά της θεμέλιας οργανικής ουσίας του πολφού. Στον ανθρώπινο πολφό συναντώνται οι συνήθεις πρωτεογλυκάνες των συνδετικών ιστών όπως η θειική χονδροϊτίνη, η θειική δερματάνη και το υαλουρονικό οξύ. Είναι υδρόφιλα μόρια και αναπτύσσονται σε ένα εκτεταμένο δίκτυο, υπό μορφή γέλης, μέσα στο οποίο μπορεί να συγκρατείται μεγάλη ποσότητα νερού. Πολλά συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας, όπως οι αυξητικοί παράγοντες (ανάμεσα στους οποίους και ο TGFβ), το κολλαγόνο και η φιβρονεκτίνη, συνδέονται χημικά με τις πρωτεογλυκάνες. Εξ αιτίας αυτού, το δίκτυο των πρωτεογλυκανών φαίνεται να δρα ως δεξαμενή βιολογικά ενεργών μορίων. Ελέγχει, ταυτόχρονα, και την οργάνωση του ιστού, συνδέοντας μαζί διαφορετικά συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας.

Ένα από τα βασικά συστατικά της θεμέλιας ουσίας του πολφού είναι η ινονεκτίνη. Ανήκει στην κατηγορία των γλυκοπρωτεϊνών και αποτελεί ένα πολυ-

λειτουργικό μόριο. Στη μοριακή δομή της υπάρχουν υποδοχείς για την προσκόλληση με τα μόρια του κολλαγόνου, των γλυκοζαμινογλυκανών καθώς και με διαμεμβρανικούς υποδοχείς των κυττάρων, τις ιντεγκρίνες. Για το λόγο αυτό πιστεύεται ότι διαμεσολαβεί στην προσκόλληση, τόσο των κυττάρων μεταξύ τους, όσο και των κυττάρων με τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας, συμβάλλοντας έτσι σημαντικά στη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την οργάνωση των κυττάρων του ιστού. Η ινονεκτίνη συναντάται υπό μορφή αδιάλυτου δικτύου ινιδίων σε όλη την έκταση της εξωκυττάριας μήτρας και σε μεγαλύτερη συγκέντρωση γύρω από τα αγγεία (Lukinmaa et al, 1991; Van Amerongen et al, 1984). Ανιχνεύεται, επίσης, στην οδοντινοβλαστική στοιβάδα, όπου περιβάλλει σώματα οδοντινοβλαστών, ενώ εισέρχεται στην προ-οδοντίνη, παράλληλα με τον άξονα των αποφυάδων (Van Amerongen et al, 1984). Στη θέση αυτή διαμεσολαβεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των οδοντινοβλαστών και της εξωκυττάριας μήτρας, συμβάλλοντας στη διατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων και των στενών συνδέσεων ανάμεσά τους (Yoshida et al, 1994; 1995).

## **1.2.2 Κύτταρα πολφού**

### **1.2.2.1 Οδοντινοβλάστες**

Οι οδοντινοβλάστες είναι τα πλέον διαφοροποιημένα κύτταρα του πολφού. Η ώριμη οδοντινοβλάστη παρουσιάζει χαρακτηριστική μορφολογία με επίμηκες κυτταρικό σώμα, πόλωση του πυρήνα και παρουσία μιας μακριάς αποφυάδας (Lesot, et al, 1985; 1988). Σημαντικό ρόλο στη συνθετική και την εκκριτική λειτουργία της διαφοροποιημένης οδοντινοβλάστης παίζει η διαμερισματοποίηση των κυτταρικών οργανιδίων μέσω σχηματισμού κυτταροπλασματικού δικτύου ινιδίων. Δύο διακριτοί εκκριτικοί πόλοι έχουν παρατηρηθεί εγγύς και άπω του πυρήνα: εκείνος της αποφυάδας, στην οποία πραγματοποιείται μόνο η μεταφορά μακρομορίων και εκείνος του σώματος του κυττάρου, όπου, εκτός από τη λειτουργία της έκκρισης, πραγματοποιείται και η σύνθεση των μακρομορίων από τα υπεύθυνα οργανίδια που συγκεντρώνονται εκεί (Linde & Goldberg, 1993). Η διατήρηση της

συγκεκριμένης μορφολογίας της διαφοροποιημένης οδοντινοβλάστης εξασφαλίζεται από το δίκτυο κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών, όπως οι μικροσωληνίσκοι και τα ενδιάμεσα ινίδια βιμεντίνης και νεστίνης. Η μορφολογία της οδοντινοβλάστης αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο για την ικανότητά της να αντιδρά στα εξωτερικά ερεθίσματα και κατ' επέκταση έχει μεγάλη σημασία για την επουλωτική ικανότητα του δοντιού. Η οργάνωση του κυτταρικού σκελετού κατά τη διαφοροποίηση της οδοντινοβλάστης επηρεάζεται ανάμεσα στα άλλα από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του κυττάρου και της εξωκυττάριας μήτρας, οι οποίες διαμεσολαμβάνονται τόσο μέσω πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης όσο και από διαφόρων τύπων διακυτταρικές συνδέσεις. Έχει φανεί ότι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που προσδένει τη φμπρονεκτίνη της εξωκυττάριας μήτρας (non-integrin 165-kDa fibronectin-binding protein) συμμετέχει στην αναδιοργάνωση των μικροϊνιδίων του κυτταροπλάσματος και εκφράζεται παροδικά κατά τη διαφοροποίηση της οδοντινοβλάστης (Lesot, et al, 1985; 1988). Οι χασματικές και οι στενές διακυτταρικές συνδέσεις παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση του κυτταρικού σκελετού της διαφοροποιημένης οδοντινοβλάστης και κατ' επέκταση στη λειτουργία της. Το γεγονός αυτό γίνεται περισσότερο φανερό όταν η γήρανση του κυττάρου, με την επακόλουθη μείωση της εκκριτικής του λειτουργίας, έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της δομής των διακυτταρικών συνδέσεων και επομένως της σχέσης του με τα άλλα κύτταρα (Ushiyama, 1989).

#### **1.2.2.2 Άλλα κύτταρα του πολφού**

Το μεγαλύτερο αριθμητικά πληθυσμό του πολφού τον αποτελούν οι ινοβλάστες. Πρόκειται για κύτταρα ικανά να συνθέτουν και να μεταβολίζουν τα βασικά συστατικά της θεμέλιας ουσίας του συνδετικού ιστού, παίζοντας έτσι βασικό ρόλο στην οργάνωσή του. Η βασική τους λειτουργία στον πολφό είναι η σύνθεση και η έκκριση του κολλαγόνου τύπου I και III, καθώς και των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών, όπως των πρωτεογλυκανών και της ινονεκτίνης. Η αποδόμηση των συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως π.χ. του κολλαγόνου, πραγματοποιείται επίσης από τις ινοβλάστες, ενδοκυτταρικά, με τη βοήθεια

λυσοσωμικών ενζύμων. Επιπλέον, εκκρίνουν μια μεγάλη κατηγορία ενζύμων, τις μεταλλοπρωτεΐνάσες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αποδόμηση των πρωτεϊνών.

Μία ακόμα κατηγορία των κυττάρων του πολφού αποτελούν τα βλαστικά αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα. Ανιχνεύονται συνήθως γύρω από τα αγγεία του πολφού. Το σχήμα τους είναι επίμηκες και παρουσιάζουν μεγάλη αναλογία πυρήνα-κυτταροπλάσματος. Ο πληθυσμός τους δεν είναι σταθερός κατά τη διάρκεια της ζωής, καθώς τείνει να μειώνεται, μειώνοντας ταυτόχρονα και την αναγεννητική ικανότητα του πολφού ως απάντηση σε εξωτερικά ερεθίσματα. Οι Gronthos και συν (2000) απομόνωσαν για πρώτη φορά βλαστικά κύτταρα του ανθρώπινου πολφού, τα οδοντικά βλαστικά κύτταρα του πολφού, τα DPSC. Τα κύτταρα αυτά παρουσίαζαν δυναμικό διαφοροποίησης προς την κατεύθυνση οδοντινοβλαστών, νευρικών κυττάρων και λιποκυττάρων. Παρόμοιος πληθυσμός βλαστικών κυττάρων, αν και λιγότερο ώριμος, απομονώθηκε και από τον πολφό νεογιλών δοντιών (βλαστικά κύτταρα από ανθρώπινο πολφό εξαχθέντων νεογιλών δοντιών, SHEDs) (Gronthos et al, 2000), την οδοντική θηλή (SCAP) (Sonoyama et al, 2006), τον περιοδοντικό σύνδεσμο (Seo et al, 2004; Ji et al, 2013), το οδοντοθυλάκιο (DFSC) (Morsczeck et al, 2005), το στοματικό βλεννογόνο και τα ούλα (Zhang et al, 2012). Σε μελέτη, όπου τα βλαστικά κύτταρα του πολφού τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια οδοντίνης, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της DSP από τα κύτταρα αυτά, καθώς και ο σχηματισμός επανορθωτικής οδοντίνης (Batouli et al, 2003). Απομόνωση των βλαστικών κυττάρων από το οδοντικό σπέρμα, σε ειδικές συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας, οδήγησε στη διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών σε κύτταρα δίκην-οδοντινοβλαστών, με αυξημένη έκφραση αλκαλικής φωσφατάσης, DSP, κολλαγόνου τύπου I, μη-κολλαγονούχων πρωτεϊνών και των γονιδίων για DSPP και DMP-1. Η επαγωγή των οδοντικών βλαστικών κυττάρων του πολφού με TGC-CM (Tooth Germ Cells-Conditioned Medium) προς κύτταρα δίκην-οδοντινοβλαστών οδήγησε στο σχηματισμό προ-οδοντίνης και μεταλλικοποιημένης οδοντίνης (Yu et al, 2006,). Σε *in vivo* μελέτες, όπου DPSC τοποθετήθηκε σε ριζικούς σωλήνες, παρατηρήθηκε αναγέννηση του συμπλέγματος πολφού οδοντίνης, με σχηματισμό αγγειακού δικτύου και ενασβεστωμένου ιστού στα τοιχώματα του ριζικού σωλήνα, που προσομοίαζε με την οδοντίνη (Wang et al, 2013; Huang et al, 2010).

Μεταμόσχευση τομών δοντιού με ικρίωμα εμποτισμένο με SHED σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια, οδήγησε στο σχηματισμό σωληναριακής οδοντίνης (Sakai et al, 2010; Rosa et al, 2011). Τα βλαστικά κύτταρα μπορούν να πάρουν, ανάμεσα στα άλλα, και την κατεύθυνση διαφοροποίησης προς ενδοθηλιακά και νευρικά κύτταρα, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει την αναγέννηση του αγγειακού και του νευρικού δικτύου (d'Aquino et al, 2007; Arthur et al, 2008).

Τα αμυντικά κύτταρα του πολφού αποτελούν επίσης ένα σημαντικό κυτταρικό πληθυσμό, δεδομένου ότι ο πολφός παίζει ενεργό ρόλο στην προστασία του ίδιου του εαυτού του από τη μικροβιακή προσβολή. Ο πληθυσμός των αμυντικών κυττάρων του πολφού απαρτίζεται βασικά από τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα Τ-λεμφοκύτταρα. Σπανίως σε φυσιολογικό πολφό μπορούν να ανιχνευτούν τα Β-λεμφοκύτταρα (Okiji et al, 1992). Η σύνθεση των Τ-λεμφοκυττάρων του πολφού μοιάζει με εκείνη των άλλων συνδετικών ιστών. Συναντώνται σε μικρούς αριθμούς κατά μήκος των τοιχωμάτων των αγγείων του πολφού. Τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα του πολφού αποτελούν τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που εκφράζουν στην επιφάνειά τους μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II. Τα μακροφάγα ανιχνεύονται κατά μήκος των αγγείων του πολφού. Παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη της δευτερογενούς ανοσολογικής απάντησης αλληλεπιδρώντας με τα Τ-λεμφοκύτταρα μνήμης, στα οποία παρουσιάζουν αντιγόνα που εισβάλλουν στον πολφό. Τα δενδριτικά κύτταρα σχηματίζουν ένα εκτεταμένο δίκτυο κυττάρων σε όλη την έκταση του πολφού και κυρίως στην περιφέρεια, κοντά στην οδοντινοβλαστική στοιβάδα. Οι αποφυάδες των κυττάρων αυτών, τρεις ή περισσότερες μήκους 50μm, επεκτείνονται στα οδοντινοσωληνάρια μαζί με τις αποφυάδες των οδοντινοβλαστών (Sakurai et al, 1999).

### **1.2.2.3 Βασικές ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες – Βιμεντίνη**

Μια σειρά πιο ειδικών ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών έχει αναφερθεί για τα κύτταρα του πολφού. Οι πρωτεΐνες αυτές σχετίζονται με την οργάνωση σημαντικών

μορίων που εμπλέκονται στη σύνθεση και την αποδόμηση των συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, τη διαφοροποίηση, την προσκόλληση και τη μετανάστευση των κυττάρων, καθώς και σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι οι: βιμεντίνη, νεστίνη, κονεξίνη 43, α-ακτίνη λείων μυϊκών ινών, SMAD1,-5, Noggin, Tenascin C κ.α. Η βιμεντίνη ανήκει στην κατηγορία ενδιάμεσων ινιδίων τάξης III και αποτελεί βασικό συστατικό του κυτταρικού σκελετού. Πολλές μελέτες έχουν συσχετίσει τη βιμεντίνη με την επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάβαση και τη μεταναστευτική ικανότητα καρκινικών κυττάρων (Hendrix et al, 1996; Lang et al, 2002; Singh et al, 2003), ενώ η αναστολή της έκφρασης της βιμεντίνης στις ινοβλάστες έχει συσχετιστεί με τη μειωμένη μηχανική σταθερότητα των κυττάρων και τη μειωμένη κινητικότητά τους προς τη κατεύθυνση χημειοτακτικών παραγόντων (Eckes et al, 1998). Επίσης, η αναστολή της έκφρασης της βιμεντίνης στα νεφρικά κύτταρα σκύλου έχει συσχετιστεί με τη μειωμένη ικανότητα του ιστού για επούλωση μετά από τραύμα, εξαιτίας και πάλι της μειωμένης κινητικότητας των κυττάρων προς συγκεκριμένη κατεύθυνση (Phua et al, 2009).

Έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα του mRNA για τη βιμεντίνη είναι υψηλότερα στα μεσεγχυματικά κύτταρα του πνεύμονα σε σχέση με τα μεσεγχυματικά κύτταρα άλλων ιστών. Εκφράζεται ισχυρά τόσο στο κυτταρόπλασμα των ινοβλαστών, όσο και στις οδοντινοβλάστες, αλλά και σε βλαστικά κύτταρα του πνεύμονα. Μάλιστα η ικανότητα, που αποκτάει το αδιαφοροποίητο μεσεγχυματικό κύτταρο σε κάποιο στάδιο της διαφοροποίησής του, να συνθέτει βιμεντίνη υποδηλώνει και το βαθμό της διαφοροποίησής του. Έτσι, η βιμεντίνη, αν και δεν είναι μια πρωτεΐνη αποκλειστική των πολφικών κυττάρων, μπορεί να αποτελεί ένα ποιοτικό δείκτη της διαφοροποίησης των αρχέγονων κυττάρων του πνεύμονα προς ώριμα πολφικά κύτταρα και επομένως μπορεί να αποτελεί ένα δείκτη της αναγεννητικής ικανότητας του πνεύμονα (Murakami et al, 2012).

Στις μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες ανήκει και η οικογένεια των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών, γνωστών ως SIBLINGS, οι οποίες παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στη μεταλλικοποίηση του οργανικού υποστρώματος οδοντίνης, ρυθμίζοντας το

σηματισμό των κρυστάλλων υδροξυαπατίτη. Στην οικογένεια αυτή ανήκουν οι DPP και DSP, DMP-1 και οστεοποντίνη. Εμφανίζονται αποκλειστικά στην οδοντίνη αλλά δεν συντίθενται αποκλειστικά από τις οδοντινοβλάστες. Στις μη κολλαγονούχες, μη φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες ανήκουν οι οστεονεκτίνη, οστεοκαλσίνη, διγλυκάνη, δικορίνη κ.α. πρωτεΐνες, των οποίων ο ρόλος δεν είναι τελείως σαφής. Φαίνεται να είναι ρυθμιστικός στη μεταλλικοποίηση του οργανικού υποστρώματος της οδοντίνης (Bègue-Kirnetal, 1998; Bleicher et al, 1999).

Μέρος των μορίων που συνθέτουν και εκκρίνουν οι οδοντινοβλάστες κατά το σχηματισμό της οργανικής μήτρας αποτελούν οι αυξητικοί παράγοντες της οικογένειας TGFβ/BMP, IGF, FGF. Οι αυξητικοί παράγοντες παίζουν καθοριστικό ρόλο στο σχηματισμό της πρωτογενούς οδοντίνης κατά την ανάπτυξη του δοντιού, δεν είναι ωστόσο ειδικοί για τις οδοντινοβλάστες (Septier et al, 1998; Cassidy et al, 1997; Linde, 1995; Fukae et al, 1991). Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της οικογένειας MMP καθώς και ο αναστολέας τους, TIM-1, συντίθενται επίσης από τις οδοντινοβλάστες, αλλά όχι αποκλειστικά, και αποτελούν ισχυρούς ενεργοποιητές των αυξητικών παραγόντων και των SIBLINGs. Ο ρόλος τέτοιων μορίων, μόρια που διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στο σχηματισμό της πρωτογενούς οδοντίνης, δεν είναι ακόμα διευκρινισμένος και στην περίπτωση σχηματισμού αντιδραστικής και επανορθωτικής οδοντίνης κατά την επούλωση τραύματος.

## **2. Επίδραση υλικών κάλυψης στο σύμπλεγμα οδοντίνης-πολφού**

Η σύγχρονη κλινική οδοντιατρική προσέγγιση αποσκοπεί στη διατήρηση των οδοντικών ιστών και στην προστασία του συμπλέγματος οδοντίνης-πολφού με την ελάχιστη δυνατή θεραπευτική παρέμβαση (Saghiri et al, 2016). Η θεραπεία ζωντανού πολφού αποτελεί μια πρακτική εναρμονισμένη με την παραπάνω φιλοσοφία που εφαρμόζεται εδώ και πάνω από διακόσια χρόνια. Συνίσταται στην εφαρμογή βιοϋλικού προστασίας (παραγόνα κάλυψης) είτε πάνω σε εναπομείναν λεπτό στρώμα οδοντίνης πάνω από τον πολφό (έμμεση κάλυψη πολφού), είτε απευθείας στον πολφό, στην περίπτωση αποκάλυψής του (άμεση κάλυψη πολφού),

είτε πάνω στον πολφό μετά την αφαίρεση μέρους προσβεβλημένου ιστού (πολφοτομή). Η πρώτη αναφορά στη θεραπεία ζωντανού πολφού έγινε το 1756 από τον Pfaff (Marques et al, 2015), ενώ εκατό χρόνια αργότερα περιγράφηκαν υλικά κάλυψης πολφού με βάση το υδροξείδιο του ασβεστίου  $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ , η χρήση των οποίων καθιερώθηκε μετά τη δημοσίευση του Hermann το 1930. Έως σήμερα, το  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  σε διάφορες μορφές είναι το βασικό υλικό κάλυψης του πολφού και αποτελεί τη χρυσή σταθερά στις σύγχρονες μελέτες βιοσυμβατότητας.

Παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα χρήσης του  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  στη θεραπεία ζωντανού πολφού, η μεγάλη διαλυτότητά του, η μη συγκόλλησή του με οδοντικούς ιστούς και οι φτωχές μηχανικές ιδιότητές του, οδήγησαν στην δοκιμή άλλων υλικών για κάλυψη του πολφού, όπως οι συγκολλητικοί παράγοντες σύνθετων ρητινών τα υλικά με βάση το MTA κ.α. (Bergenholtz et al, 2013; Parisay et al, 2015; Roberts et al, 2008; da Rosa et al, 2017). Ιδανικά, το υλικό κάλυψης θα πρέπει να είναι μη τοξικό για τα κύτταρα του πολφού, να προάγει την επούλωσή του, να διαθέτει αντιμικροβιακές ιδιότητες, να μπορεί να συγκολληθεί με τους οδοντικούς ιστούς και να είναι αδιάλυτο από τα ιστικά υγρά.

## **2.1 Επίδραση του $\text{Ca}(\text{OH})_2$ στο σύμπλεγμα οδοντίνης-πολφού**

Για πρώτη φορά η χρήση του  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  στην οδοντιατρική προτάθηκε από τον Hermann το 1930, όταν ο τελευταίος παρουσίασε την ικανότητα του υλικού να διεγείρει τα κύτταρα του πολφού να παράγουν επανορθωτική οδοντίνη, σχηματίζοντας ένα φραγμό στο σημείο της αποκάλυψης (Stanley & Pameijer, 1997). Ήδη από το 1939 οι ερευνητικές μελέτες που πραγματοποιούνται αναφέρουν το σχηματισμό γέφυρας οδοντίνης, μερικές εβδομάδες μετά την εφαρμογή του  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  και σε διαφορετικές αποστάσεις από τη μεσόφαση υλικού-πολφού, κατά μήκος της οποίας παρατηρούν επιμήκη δίκην-οδοντινοβλάστης κύτταρα (Zander, 1939; Glass et al, 1949; Nowicka et al, 2016; Silva et al, 2013).



Το  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , είτε χημικά καθαρό φύραμα, είτε ως ταχύπηκτο σκεύασμα με ρητινώδη έκδοχα, έχει πολύπλευρη δράση, ένα μεγάλο μέρος της οποίας οφείλεται στο έντονα αλκαλικό pH που παρουσιάζει. Το pH του καθαρού  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  είναι 12.2 ενώ των ταχύπηκτων σκευασμάτων κυμαίνεται περίπου στο 11. Όταν το καθαρό  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  έρχεται σε επαφή με τον πολφό προκαλεί, εξαιτίας του υψηλού pH, τοπική πηκτική νέκρωση του πολφικού ιστού, πάχους περίπου 2mm, γύρω από το σημείο της κάλυψης. Ταυτόχρονα, σχηματίζονται σφαιρίδια ανθρακικού ασβεστίου, τα οποία θα αποτελέσουν τους πρώτους πυρήνες ενασβεστίωσης γύρω από τους οποίους θα αρχίσει ο σχηματισμός της επανορθωτικής οδοντίνης (Pereira et al, 1980). Η τυπική αυτή αντίδραση δεν παρατηρείται σε πολλά από τα εμπορικά σκευάσματα με βασικό συστατικό το  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  που κυκλοφορούν στην αγορά (Dycal, Prisma VLC Dycal, Life), τα οποία πήζουν είτε με τη βοήθεια σκληρυντικών παραγόντων που περιέχουν, είτε με φωτοπολυμερισμό και είναι λιγότερο αλκαλικά από το φύραμα του καθαρού  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Η διαφορετική ποσότητα  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  που απελευθερώνουν τα σκευάσματα αυτά καθώς και οι διαφορετικές φυσικομηχανικές τους ιδιότητες, όπως η διαλυτότητα, εξηγούν ίσως και τη διαφορετική τους αποτελεσματικότητα σε σχέση με το καθαρό  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (Lombardi et al, 1991; de Freitas, 1982). Ο πολφικός ιστός που βρίσκεται σε άμεση επαφή με τα υλικά αυτά υφίσταται κάποιες χημικές τροποποιήσεις. Δεν παρουσιάζει την κλασική πηκτική νέκρωση αλλά μάλλον μια μορφή αποδόμησης, με αποτέλεσμα η επουλωτική διαδικασία να πραγματοποιείται σε απευθείας επαφή με το υλικό, και όχι σε επαφή με τη νεκρωτική ζώνη που υπάρχει ανάμεσα στο καθαρό  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  και τον πολφικό ιστό. Σε κάθε περίπτωση, η επουλωτική διαδικασία δεν προάγεται από το  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  αυτό καθαυτό, αλλά από τον υποκείμενο πολφικό ιστό, ο οποίος παραμένει υγιής. Στις κλασικές μελέτες βιοσυμβατότητας του  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  έχει φανεί ότι οι μεσολαβητές της φλεγμονής που απελευθερώνονται στο σημείο της νέκρωσης προσελκύουν πρόδρομα κύτταρα του πολφού και ενεργοποιούν την επουλωτική διαδικασία κατά την οποία θα σχηματιστεί η επανορθωτική οδοντίνη. Μία από τις πιθανολογούμενες δράσεις του  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  φαίνεται να είναι και η ικανότητά του να διαλυτοποιεί αυξητικούς παράγοντες, όπως ο TGFβ-1, μη-κολλαγονούχες πρωτεΐνες και γλυκοζαμινογλυκάνες από την οργανική μήτρα της οδοντίνης, συμβάλλοντας με

αυτόν τον μηχανισμό στην αλληλεπίδραση των παραγόντων αυτών με τα κύτταρα. Επίσης το αλκαλικό pH και η αυξημένη τοπική συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου στον πολφό προάγει στα πολφικά κύτταρα την έκφραση γονιδίων υπεύθυνων για τη μεταλλικοποίηση του υποστρώματος (Graham et al, 2006). Στους παραπάνω μηχανισμούς δράσης του  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  θα πρέπει να προστεθεί και η ικανότητά του να εξουδετερώνει οξέα, όπως το γαλακτικό οξύ που παράγεται από τις οστεοκλάστες κατά τη φλεγμονή του πολφού, να προάγει τη μεταλλικοποίηση μέσω ελεύθερων ιόντων υδροξυλίου και να ενεργοποιεί την αλκαλική φωσφατάση (Tronstad et al, 1981; Medina et al, 2002). Στο υψηλό pH του  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  οφείλεται και η σημαντική αντιμικροβιακή δράση με την οποία εξασφαλίζεται και το απαραίτητο άσηπτο περιβάλλον για τα κύτταρα του πολφού. Εφόσον αυτό το άσηπτο περιβάλλον διατηρείται και σε βάθος χρόνου από το υλικό της αποκατάστασης της κοιλότητας, η επουλωτική διαδικασία προχωράει στο σχηματισμό γέφυρας οδοντίνης, η οποία σύμφωνα με πολλούς ερευνητές αποδεικνύει και την επιτυχή έκβαση της θεραπείας. Οι μελέτες ωστόσο αναφέρουν ότι η γέφυρα οδοντίνης που σχηματίζεται είναι ατελής και πορώδης και δεν είναι σε θέση να εξασφαλίσει στον πολφό την απαραίτητη προστασία από μία ενδεχόμενη μικροδιείσδυση (Cox et al, 1996; Akimoto et al, 1998).

Σύγχρονες έρευνες έχουν ασχοληθεί εκτενώς με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της γέφυρας οδοντίνης και τον τρόπο που μπορεί να επηρεάζουν την επούλωση του συμπλέγματος οδοντίνης-πολφού. Πρώτον, το πορώδες της γέφυρας οδοντίνης φαίνεται να σχετίζεται με το μέγεθος της αποκάλυψης του πολφού, καθώς σε μία μεγαλύτερη αποκάλυψη θα υπάρξει μεγαλύτερη διάχυση των ξεσμάτων οδοντίνης και των συστατικών του υλικού κάλυψης, τα οποία όλα είναι ικανά να εμποδίσουν τον πλήρη σχηματισμό της γέφυρας (Kitasako et al, 2002). Δεύτερον, η πυκνότητα των πόρων φαίνεται να σχετίζεται με τον αριθμό των αγγείων που τραυματίστηκαν. Μέσα στους πόρους της σχηματιζόμενης γέφυρας έχει παρατηρηθεί πλούσιο αγγειακό δίκτυο, διαμέσου του οποίου η περιοχή της νέκρωσης τροφοδοτείται με ιόντα ασβεστίου, τα οποία θεωρούνται υπεύθυνα για την επακόλουθη ενασβεσίωση της περιοχής. Τέλος, στους πόρους της γέφυρας οδοντίνης έχουν παρατηρηθεί κύτταρα ικανά να παράγουν, στα πλαίσια της επουλωτικής

διαδικασίας, την επανορθωτική οδοντίνη (Pereira et al, 2000). Τα παραπάνω ευρήματα συμβάλλουν πλέον στην άποψη ότι η παρουσία ενός σκληρού ιστού στην περιοχή της αποκάλυψης του πολφού δεν αποτελεί μόνο μηχανικό φραγμό ενάντια στα μελλοντικά ερεθίσματα, αλλά επίσης είναι ένδειξη της βιολογικής ανάκαμψης και επούλωσης (Modena et al, 2009).

Ενώ οι προαναφερθείσες ιδιότητες του  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  έχουν διερευνηθεί επαρκώς, αμφιβολίες υπάρχουν σχετικά με τη βιοσυμβατότητά του και με κάποιες φυσικές και μηχανικές του ιδιότητες όπως είναι η διαλυτότητα και η αντίσταση στη μηχανική φόρτιση. Φαίνεται ότι κάποια σκευάσματα  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  υφίστανται αποδόμηση με την πάροδο του χρόνου και συγκεκριμένα εμφανίζουν τάση διάλυσης 1-2 χρόνια μετά από την εφαρμογή τους (Stanley & Pameijer, 1997; Schuur et al, 2000). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την κακή εμφρακτική ικανότητα των υλικών αυτών, οφειλόμενη στην έλλειψη ικανότητας σύνδεσης ή συγκόλλησης με την οδοντίνη, αποτελεί ένα μειονέκτημα, γιατί δυνητικά επιτρέπει τη διείσδυση μικροβίων, γεγονός που με τη σειρά του θεωρείται υπεύθυνο για τη φλεγμονή και τη νέκρωση του πολφού.

## **2.2 Επίδραση των συγκολλητικών συστημάτων στο σύμπλεγμα οδοντίνης-πολφού**

Η εισαγωγή των συγκολλητικών παραγόντων συνθέτων ρητινών ως υλικών άμεσης κάλυψης του πολφού προέκυψε από τη διαπίστωση της ιδιαίτερης σημασίας της ερμητικής απόφραξης στο σημείο της αποκάλυψής του, στη θεραπεία του ζωντανού πολφού. Ο σχηματισμός της υβριδικής ζώνης, μέρος του μηχανισμού συγκόλλησης των παραγόντων με την οδοντίνη, δυνητικά εξασφαλίζει τη ζητούμενη απόφραξη, δημιουργώντας, έτσι, συνθήκες για την ανάπτυξη του επουλωτικού μηχανισμού του πολφού. Οι μελέτες βιοσυμβατότητας και κυτταροτοξικότητας ωστόσο που ακολούθησαν άφησαν πολλά ανοιχτά ερωτήματα στο κατά πόσο είναι ασφαλής η χρήση των συγκολλητικών συστημάτων ως υλικών άμεσης κάλυψης του πολφού (Watts & Paterson, 1987).

### 2.2.1 Κυτταροτοξικότητα των συγκολλητικών συστημάτων

Αν και οι αρχικές κλινικές μελέτες έδειξαν καλή ανοχή του πολφού στα ρητινώδη συστήματα όταν τα τελευταία δεν έρχονταν σε άμεση επαφή με τον πολφικό ιστό, *in vitro* μελέτες, που ακολούθησαν, ανέδειξαν μια σειρά χαρακτηριστικών γνωρισμάτων των ρητινών που προβληματίζουν έντονα σχετικά με την ασφάλεια της χρήσης τους για τη θεραπεία ζωντανού πολφού. Ήδη από τις πρώτες μελέτες φάνηκε ότι μόλις μέσα σε λίγες ώρες, ένα μέρος από τα απολυμέριστα μονομερή και συν-μονομερή των ρητινωδών συστημάτων, όπως το Bis-GMA, UDMA, TEGDMA και HEMA, μπορεί να διαλυθεί σε οργανικούς διαλύτες, όπως η αιθανόλη, αλλά και σε διαλύτες με βάση το νερό. Τα μονομερή αυτά, και ιδιαίτερα το TEGDMA και το HEMA, διαχέονται μέσα από την οδοντίνη στον πολφό στην περίπτωση έμμεσης κάλυψης ή απευθείας στον πολφό στην περίπτωση της άμεσης κάλυψής του. Μάλιστα τα υδρόφιλα και μικρού μοριακού βάρους μονομερή όπως το HEMA και TEGDMA απελευθερώνονται από τη ρητινώδη μήτρα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα υδρόφοβα μόρια μεγάλου μοριακού βάρους όπως το Bis-GMA. Άλλα συστατικά, όπως η καμφοροκινόνη, βρέθηκαν να απελευθερώνονται επίσης σε οργανικούς κυρίως διαλύτες και μάλιστα σε σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις (van Landuyt et al, 2011; Ferracane & Condon, 1990; Freud & Munksgaard, 1990).

Οι μελέτες που ακολούθησαν εστίασαν στην αυτή καθαυτή κυτταροτοξικότητα των διαφόρων συστατικών των συγκολλητικών συστημάτων προκειμένου να αποσαφηνιστεί η δράση τους στην περίπτωση της τοποθέτησής τους σε ζωντανό πολφό (Hanks et al, 1991; Kraus et al, 2017). Οι τιμές του ED<sub>50</sub> στη μελέτη του κυτταροτοξικού δυναμικού 35 συστατικών εμπορικών ρητινωδών συστημάτων σε κυτταρική σειρά 3T3 και ινοβλάστες πολφού, έδειξαν ότι τα μονομερή UDMA (0.06-0.47mM), Bis-GMA (0.08-0.14mM), Bis-MA (0.1-0.16mM), DEGDMA (0.07-0.18mM), TEGDMA (0.12-0.26mM) είναι τα πλέον τοξικά (Geurtsen et al, 1998). Ο αναστολέας πολυμερισμού BHT και ο φωτοσταθεροποιητής HMBP έδειξαν επίσης μεγάλη τοξικότητα (Saito et al, 2003; Geurtsen et al, 1998). HEMA και καμφοροκινόνη παρουσίασαν μέτρια τοξικότητα (Geurtsen et al, 1998; Pagoria et al, 2005). Από τα παραπάνω μονομερή το Bis-GMA έχει ενοχοποιηθεί για την αιμολυτική του δράση,

βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης λόγω οξειδωσης και τη χρόνια τοξικότητα εξαιτίας της ικανότητάς του να καταστέλλει το μεταβολισμό του κυττάρου. Σε αντίθεση με μεγάλα υδρόφοβα μονομερή όπως το Bis-GMA και UDMA, μικρότερα και περισσότερα υδρόφιλα μόρια όπως TEGDMA και HEMA, μπορούν να απελευθερωθούν από τη ρητινώδη μήτρα σε συγκεντρώσεις πολύ μεγαλύτερες από το ED<sub>50</sub>. Το TEGDMA έχει ενοχοποιηθεί για τη μικροσωμιακή υπεροξείδωση και τη δράση του πάνω στα λιποσώματα ως επιφανειοδραστικός παράγοντας προκαλώντας τη διαλυτοποίηση της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Τα Bis-GMA, TEGDMA και HEMA έχουν ενοχοποιηθεί επίσης για την απόπτωση των κυττάρων, την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης, της σύνθεσης DNA, της κυτταρικής αναπνοής και της κυτταρικής διαφοροποίησης, πιθανόν λόγω της αύξησης των ενδοκυττάρων επιπέδων ελεύθερων ριζών (Pagoria et al, 2005; Pawlowska et al, 2010; Chang et al, 2010; Jontell et al, 1995).

Σε καλλιέργεια ινοβλαστών ποντικού Balb/c 3T3, η σειρά τοξικότητας των βασικών συστατικών των ρητινωδών συστημάτων διαμορφώθηκε ως εξής: Bis-GMA > UDMA > TEGDMA >>> HEMA (λιγότερο τοξικό) μετά από 24 και 72 ώρες (Ratanasathien et al, 1995). Τα ίδια μονομερή σε διάφορους συνδυασμούς ανά δύο μεταξύ τους παρουσίαζαν αλληλεπίδραση που μπορούσε να είναι συνεργική, αθροιστική ή ανταγωνιστική και μάλιστα σε τοξικές δόσεις μικρότερες από τις τοξικές δόσεις των αντίστοιχων μονομερών. Μια πολύ σημαντική παρατήρηση ήταν και το γεγονός ότι η τοξικότητα τόσο των μεμονωμένων μονομερών όσο και των συνδυασμών τους αυξανόταν με την πάροδο του χρόνου (Ratanasathien et al, 1995; Durner et al, 2012). Η προσθήκη εξάλλου των παραπάνω μονομερών σε μη τοξικές συγκεντρώσεις στην καλλιέργεια των κυττάρων μείωσε σημαντικά την έκφραση του κολλαγόνου I από τις ινοβλάστες καθώς και της οστεονεκτίνης και της σιαλοπρωτεΐνης της οδοντίνης, πρωτεΐνες, που παίζουν ρόλο στη μεταλλικοποίηση του οργανικού υποστρώματος της προ-οδοντίνης κατά το σχηματισμό της επανορθωτικής οδοντίνης (About et al, 2002).

Όταν μελετήθηκαν τα εμπορικά συστήματα συγκολλητικών παραγόντων, τα αποτελέσματα ήταν επίσης αποθαρρυντικά. Τόσο τα όξινα όσο και τα μη όξινα

συστατικά των απολυμέριστων συγκολλητικών παραγόντων φαίνεται να είναι τοξικά για τα κύτταρα του πολφού. Η τοξικότητα τείνει να μειώνεται μετά τον πολυμερισμό και την έκπλυση, καθώς απομακρύνονται τα όξινα συστατικά και τα απολυμέριστα μονομερή. Η παραμένουσα τοξικότητα των συγκολλητικών συστημάτων φαίνεται να σχετίζεται με μεγάλη συγκέντρωσή τους σε HEMA. Η απελευθέρωση του υδρόφιλου HEMA με την πάροδο του χρόνου και η προκαλούμενη από το HEMA διαλυτοποίηση του Bis-GMA συμβάλλουν στη διατήρηση της τοξικότητας των συγκολλητικών παραγόντων (van Landuyt et al, 2011; Gallorini et al, 2014; Costa et al, 1999; De Souza Costa 2003). Η αρχική τοξικότητα των συγκολλητικών παραγόντων, σχετιζόμενη με τη σύνθεσή και το βαθμό πολυμερισμού τους, εκφράζεται τόσο με τη μείωση του αριθμού των κυττάρων όσο και την απόπτωσή τους όσο και την αναχαίτιση του κυτταρικού κύκλου, γεγονότα που αποδίδονται στην αύξηση των επιπέδων των ελεύθερων ριζών και τη μείωση της αποτελεσματικότητας των αντιοξειδωτικών συστημάτων του κυττάρου (Li et al, 2012; Cavalcanti et al, 2005; Chen et al, 2003; Mantellini et al, 2003).

Η εφαρμογή φωσφορικού οξέος 35-37% στο στάδιο της αδροποίησης φαίνεται να αυξάνει την κυτταροτοξικότητα των συγκολλητικών συστημάτων επειδή προκαλεί αυξημένη διαπερατότητα της οδοντίνης και αυξημένη διάχυση των απολυμέριστων μονομερών προς τον πολφό. Σε σύγκριση με τα συγκολλητικά συστήματα που απαιτούν χρήση φωσφορικού οξέος, τα αυτοαδροποιητικά συγκολλητικά συστήματα, στα οποία η παραμένουσα ζώνη ξεσμάτων προστατεύει εν μέρη τον πολφό από τη διάχυση των τοξικών παραγόντων, φαίνεται να είναι λιγότερο τοξικά για τα κύτταρα του πολφού (Vajrabhaya et al, 2003).

Σε αντίθεση με τις μελέτες κυτταροτοξικότητας, οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε πειραματόζωα έδειξαν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα της άμεσης κάλυψης του πολφού πιθήκων με διαφορετικά συγκολλητικά συστήματα έδειξαν απουσία τοξικότητας, αν δεν υπήρχε μικροβιακή μικροδιείσδυση, ήπια φλεγμονώδη αντίδραση, καθώς και στρωματοποίηση, πόλωση και διαφοροποίηση κυττάρων του πολφού σε κύτταρα δίκην-οδοντινοβλάστης, ικανών να σχηματίσουν γέφυρα οδοντίνης (Akimoto et al, 1998; Kitasako et al, 1999;

2002; Medina et al, 2002). Η εφαρμογή ωστόσο του φωσφορικού οξέος στο στάδιο της αδροποίησης αποδείχτηκε καταστροφική για τη βιωσιμότητα του πλφού, ο οποίος νεκρώθηκε στην πλειονότητα των περιπτώσεων, ανεξαρτήτως συγκολλητικού συστήματος ή παρουσίας μικροβίων (Pamejer & Stanley, 1998).

Τα πειραματικά μοντέλα σε σκυλιά δείχνουν επίσης αντικρουόμενα αποτελέσματα, με παρατήρηση μέσης έως ισχυρής φλεγμονώδους αντίδρασης του πλφού, ιστικής νέκρωσης και μη σχηματισμού γέφυρας οδοντίνης, έως και σχηματισμού γέφυρας οδοντίνης στην πλειονότητα των περιπτώσεων άμεσης κάλυψης του πλφού (da Silva et al, 2009; Olmez et al, 1998; Lu et al, 2006; Koliniotou & Tziafas, 2005).

Οι επίμυες χρησιμοποιήθηκαν επίσης ευρύτατα στις μελέτες για τη δράση των συγκολλητικών παραγόντων σε αποκαλυμμένους πλφούς. Τα αποτελέσματα των μελετών φαίνονται να είναι περισσότερο ξεκάθαρα σε σχέση με εκείνα των σκύλων αφού παρατηρήθηκαν επούλωση πλφού και αναδιοργάνωση της στοιβάδας οδοντινοβλαστών κάτω από τη νεοσχηματιζόμενη γέφυρα οδοντίνης (Suzuki et al, 2016; Costa et al, 2000; Kawashima et al, 2016; Shinkai et al, 2017). Ωστόσο τα συμπεράσματα από τις μελέτες σε ζώα δεν μπορούν να αναχθούν με ασφάλεια στον άνθρωπο. Τόσο το γενετικό υπόβαθρο και η ανατομία όσο και η φυσιοπαθολογία των ζώων διαφέρουν, όχι μόνο με εκείνες του ανθρώπου αλλά και ανάμεσα σε διαφορετικά είδη των ζώων. Διαφέρει επίσης η φλεγμονώδης αντίδραση και η επουλωτική ικανότητα, δεδομένου ότι σχετίζονται άμεσα με διαφορετικό ανοσοποιητικό σύστημα των ζώων σε σχέση με εκείνο του ανθρώπου (Struillou et al, 2010).

### **2.2.2 Κυτταροτοξικότητα συγκολλητικών παραγόντων και οξειδωτικό στρες**

Το οξειδωτικό στρες, δηλαδή η διατάραξη της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του κυττάρου οφειλόμενη σε αυξημένα επίπεδα των ελευθέρων ριζών (ROS), και στην ανεπάρκεια των προστατευτικών μηχανισμών του κυττάρου, φαίνεται να είναι μια από τις βασικές συνιστώσες της κυτταροτοξικότητας των μονομερών που

απελευθερώνονται από τα σύνθετα ρητινώδη υλικά. Πολλές μη αντιστρεπτές μεταβολές στη δομή και τη λειτουργία του κυττάρου, εξαιτίας της επίδρασης σε αυτά ρητινωδών μονομερών, έχουν αναφερθεί σε *in vitro* μελέτες. Βλάβες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, αναστολή της δράσης ενζύμων και πρωτεϊνών, αναστολή της σύνθεσης DNA και RNA, απόπτωση των κυττάρων είναι μερικά από τα σημεία που έχουν καταγραφεί. Όπως έχουν δείξει οι μελέτες, ο ατελής πολυμερισμός των σύνθετων ρητινών είναι βασικά υπεύθυνος για την απελευθέρωση των μονομερών όπως HEMA, TEGDMA, UDMA αλλά και μεγαλύτερων μορίων όπως BisGMA κ.α. Το πρόβλημα της κυτταροτοξικότητας των μονομερών, εκφρασμένο σε επίπεδο γονιδιακών μεταλλάξεων, βλαβών του DNA, απόπτωσης και κυτταρικού θανάτου, γίνεται ιδιαίτερα σημαντικό στην περίπτωση που τα υλικά αυτά έρχονται σε άμεση επαφή με τα κύτταρα του πολφού, όπως στην περίπτωση της άμεσης κάλυψής του με συγκολλητικά συστήματα συνθέτων ρητινών (Schweiki et al, 2001; 2005; 2006; Demirci et al, 2008).

Η οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου βασίζεται στην ισορροπία μεταξύ των επιπέδων των ROS, που μπορούν να παράγονται ενδογενώς ή να προσλαμβάνονται εξωγενώς από τα κύτταρα, και το προστατευτικό σύστημα του κυττάρου έναντι αυτών. Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει μια σειρά από ένζυμα όπως η γλουταθειόνη (GSH), η δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD), το σύστημα θειορεδοξίνης (Trx) και αναγωγάσης θειορεδοξίνης (TrxR) (Watson et al, 2004), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η καταλάση (CAT) κ.α. (Mathers et al, 2004; Levenonen et al, 2004; Hayes et al, 2005). Έχει δεχθεί ότι η κυτταροτοξικότητα ορισμένων μονομερών, όπως HEMA, UDMA και TEGDMA, σχετίζεται με την άμεση μείωση των επιπέδων της γλουταθειόνης (Engelmann et al, 2002; Volk et al, 2006; Stanislawski et al, 2003). Το αποτέλεσμα της μείωσης αυτής είναι η αύξηση των επιπέδων των ελευθέρων ριζών, η οποία με τη σειρά της συμβάλλει στην κυτταροτοξικότητα των μονομερών (Stanislawski et al, 2003). Το μονομερές TEGDMA έχει φανεί επίσης ότι μπορεί να αλλάξει τη δραστικότητα της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης P1 (GSTP1), αλλά δε φαίνεται να μεταβάλλει το βαθμό οξείδωσης της γλουταθειόνης, όπως φαίνεται από τη μη μεταβολή της αναλογίας γλουταθειόνης προς την οξειδωμένη μορφή του δισουλφιδίου της γλουταθειόνης (GSH-GSSG),



γεγονός μεγάλης σημασίας για την ομαλή λειτουργία του κυττάρου (Lefeuvre et al, 2004; Noda et al, 2006).

Σε ό,τι αφορά τη μεταλλαξιγόνο δράση των ρητινώδων μονομερών, αν και καταγράφεται θετική συσχέτιση στη βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα παραμένουν αντικρουόμενα. Για παράδειγμα, δεν σημειώθηκαν γονιδιακές μεταλλάξεις μετά την επίδραση BisGMA, UDMA και HEMA (Schweickl et al, 1998; 2001). Ωστόσο, το BisGMA είναι δυνατό να προκαλεί βλάβες του DNA, όπως φαίνεται από τα θετικά αποτελέσματα στον έλεγχο αναστολής σύνθεσης DNA (DIT) (Heil et al, 1996). Υψηλές συγκεντρώσεις HEMA μπορούν, επίσης, να προκαλέσουν χρωμοσωμικές βλάβες, όπως φαίνεται τουλάχιστον από το σχηματισμό μεγάλου αριθμού πυρηνίσκων μετά την εφαρμογή του *in vitro* (Schweickl et al, 1998; 2001). Το μονομερές TEGDMA έχει, επίσης, μεταλλαξιγόνο δράση σε κύτταρα θηλαστικών, που σχετίζεται με την εφαρμοζόμενη συγκέντρωσή του, ενώ έχει σημειωθεί και η διάσπαση της διπλής έλικας DNA μετά την εφαρμογή TEGDMA, UDMA και HEMA, σε υψηλές ωστόσο δόσεις (Kleinsasser et al, 2006). Έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί μέσω των οποίων τα παραπάνω μονομερή προκαλούν βλάβες του DNA. Σύμφωνα με τον πρώτο, το άτομο του άνθρακα στον ακόρεστο διπλό δεσμό του μονομερούς έχει θετικό φορτίο και επομένως μπορεί να αντιδράσει με πυρηνόφιλα μόρια όπως το DNA και η γλουταθειόνη. Η αλληλεπίδραση με το DNA οδηγεί στην αλλαγή της δομής του και επακόλουθες μεταλλάξεις (Besaratina & Pfeifer, 2005). Σύμφωνα με το δεύτερο, το TEGDMA και άλλα μονομερή είναι υπεύθυνα για τις οξειδωτικές βλάβες του DNA εξαιτίας της αύξησης των επιπέδων των ελεύθερων ριζών που προκαλούν. Οι σχετιζόμενες με τις ελεύθερες ρίζες βλάβες του DNA, αν παραμείνουν για κάποιο χρονικό διάστημα, είναι ικανές να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις. Εκτός από τα μονομερή, και η καμφοροκινόνη, η οποία είναι ο χαρακτηριστικός φωτοκαταλύτης που προστίθεται στα ρητινώδη μονομερή, οδηγεί στην αύξηση των ελευθέρων ριζών και τις σχετιζόμενες με αυτά βλάβες του DNA (Schweickl et al, 2006). Τα μονομερή TEGDMA και HEMA έχουν συσχετιστεί και με την αναστολή του κυτταρικού κύκλου, κυρίως λόγω βλαβών στο πυρηνικό και το μιτοχονδριακό DNA εξαιτίας της αυξημένης ενδοκυττάριας παραγωγής ελευθέρων ριζών και της μείωσης των επιπέδων της γλουταθειόνης (Chang et al, 2005; Mantellini et al, 2003). Η αναστολή

του κυτταρικού κύκλου μετά την εφαρμογή του TEGDMA έχει παρατηρηθεί κυρίως στη G2/M φάση (Schweikl et al, 2005b).

Η απόπτωση των κυττάρων έχει παρατηρηθεί σε πολλές *in vitro* μελέτες, όπου διάφορες κυτταρικές σειρές εκτίθεντο σε ποικίλες συγκεντρώσεις μονομερών, όπως TEGDMA, HEMA, BisGMA και διαφόρων συγκολλητικών συστημάτων. Ο βαθμός της απόπτωσης φαίνεται να σχετίζεται τόσο με τη συγκέντρωση των μονομερών που απελευθερώνονται, όσο και με το βαθμό του πολυμερισμού τους αλλά και την εκάστοτε σύνθεση των συγκολλητικών συστημάτων (Mantellini et al, 2003; Demirci et al, 2008). Ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα μονομερή προκαλούν απόπτωση δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα αν και υπάρχουν διάφορες υποθέσεις. Το HEMA έχει φανεί ότι μπορεί να επάγει την απόπτωση με την ενεργοποίηση του μοριακού μηχανισμού που περιλαμβάνει τις κασπάσες -8, -9 και -3 (Sragnuolo et al, 2004). Το ίδιο μονοπάτι ενεργοποιείται και από το κυτόχρωμα-c, το οποίο απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια σε περίπτωση οξειδωτικού στρες λόγω αυξημένων επιπέδων ελεύθερων ριζών, για τα οποία και πάλι μπορεί να ευθύνεται το HEMA. Ένας άλλος μηχανισμός φαίνεται να περιλαμβάνει τη βλάβη των μιτοχονδρίων με την κατάρρευση της μιτοχονδριακής μεμβράνης, εξαιτίας διαταραχής του δυναμικού της. Τέτοιες βλάβες έχουν αναφερθεί στην περίπτωση εφαρμογής του TEGDMA και φαίνεται να οφείλονται και πάλι σε αυξημένα επίπεδα των ελευθέρων ριζών που επάγει το μονομερές αυτό (Janke et al, 2003; Engelmann et al, 2004; Lefeuvre et al, 2005). Το TEGDMA είναι υπεύθυνο και για την αναστολή της φωσφορυλίωσης της κινάσης PKB/Akt στο μοριακό μονοπάτι που περιλαμβάνει PI3-K/PI3P/PIP2/PIP3/PKB/Akt και PDK-1. Το μονοπάτι αυτό είναι ουσιαστικό για την επιβίωση του κυττάρου αφού προάγει τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την απόπτωσή του, ενώ η αναστολή της φωσφορυλίωσης της PKB/Akt καθορίζει την τύχη του κυττάρου περισσότερο προς την κατεύθυνση της απόπτωσης (Sragnuolo et al, 2004(b); Downward, 2004). Το μονομερές HEMA φαίνεται να αυξάνει επίσης τη φωσφορυλίωση των κινασών p38, JNK και ERK1/2. Τα παραπάνω ανήκουν στην οικογένεια MAP-κινασών υπεύθυνων για τη μεταβίβαση προς τον πυρήνα σήματος για πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, απόπτωση και άλλες ουσιαστικές για την επιβίωσή του κυττάρου λειτουργίες, μετά την επίδραση περιβαλλοντικών αλλαγών. Τα μοριακά μονοπάτια

που περιλαμβάνουν τις p38, JNK και ERK1/2 ενεργοποιούνται και υπό την επίδραση αυξημένων επιπέδων ελευθέρων ριζών για τα οποία όπως προαναφέρθηκε είναι υπεύθυνα τα ρητινώδη μονομερή (Samuelsen et al, 2007).

### **2.2.3 Κλινικές μελέτες άμεσης κάλυψης του πολφού**

Τα αποτελέσματα κλινικών μελετών στον άνθρωπο έδειξαν ότι όταν τα συγκολλητικά συστήματα εφαρμόστηκαν απευθείας στον πολφό, ο πολφός αντέδρασε με χρόνια ή οξεία φλεγμονή και σε ορισμένες περιπτώσεις με νέκρωση, χωρίς σχηματισμό γέφυρας οδοντίνης ή με σχηματισμό ατελούς και λεπτού πάχους γέφυρας οστεοδοντίνης. Ιστική αποδιοργάνωση ποικίλης έκτασης και καταστροφή της οδοντινοβλαστικής στιβάδας ήταν συχνό εύρημα. Παρατηρήθηκαν επίσης σφαιρίδια απολυμέριστης ρητίνης στον πολφό, υπεύθυνα για την αντίδραση ξένου σώματος, με τη χαρακτηριστική παρουσία αρχικά μακροφάγων και μονοπύρηνων κυττάρων και αργότερα πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων, γεγονός που υποδήλωνε την εγκατάσταση χρόνιας πια φλεγμονής. Η περιοχή της συγκόλλησης στην οδοντίνη περιφερικά του σημείου αποκάλυψης του πολφού παρουσίαζε επίσης πολλές ατέλειες. Τα ιστολογικά ευρήματα ωστόσο δε συνοδεύτηκαν με κλινικά συμπτώματα πόνου ενώ στην πλειονότητα των περιπτώσεων δεν παρατηρήθηκε παρουσία μικροβίων (Nowicka et al, 2016; Gwinnet & Tay, 1997; Ersin & Eronat, 2005; Subay & Demirsi, 2005; Hebling et al, 1999; Pereira et al, 2000; Silva et al, 2013; Accorinte et al, 2005α).

Χειρότερα αποτελέσματα προέκυψαν στις περιπτώσεις στις οποίες στον πολφό εφαρμόστηκε κατευθείαν ο ενεργοποιητής (primer). Το βασικό συστατικό των ενεργοποιητών είναι το συν-μονομερές HEMA. Αν και οι *in vitro* μελέτες έχουν δείξει μόνο μικρή τοξικότητα του HEMA σε σχέση με το Bis-GMA, στην κλινική πράξη φαίνεται ότι το HEMA, σε επαφή με το ζωντανό πολφό, δρα πολύ πιο τοξικά. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μεγάλη συγκέντρωση του μονομερούς αυτού στον ενεργοποιητή, αλλά και στο μικρό μέγεθος του μορίου και στην έντονη υδροφιλικότητά του. Η εφαρμογή συγκολλητικής ρητίνης χωρίς τον ενεργοποιητή

απευθείας στον πολφό είχε μικρότερη τοξική δράση, πιθανόν λόγω του πολυμερισμού της ρητίνης και τη μείωση των διαχεόμενων τοξικών μονομερών προς τον πολφό (Accorinte et al, 2005α). Καλύτερα αποτελέσματα, με πιο ήπια φλεγμονώδη αντίδραση και σχηματισμό γέφυρας οδοντίνης σε κάποιες περιπτώσεις, δείχνουν οι μελέτες που εξετάζουν αυτοαδροποιητικά συγκολλητικά συστήματα (Scarano et al, 2003). Η πιθανή ερμηνεία για τη μικρότερη τοξικότητα των παραπάνω συστημάτων είναι η απελευθέρωση προς τον πολφό αυξητικών παραγόντων, π.χ TGFβ, οι οποίοι βρίσκονται σε ανενεργή μορφή στην οδοντίνη και απελευθερώνονται από αυτή όταν η τελευταία επεξεργαστεί με αυτοαδροποιητικό ενεργοποιητή. Οι αυξητικοί παράγοντες που απελευθερώνονται από την οδοντίνη και παραμένουν στο πολφό έχει βρεθεί ότι συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των κυττάρων του πολφού προς κύτταρα ικανά να παράγουν οδοντίνη (Parthasarathy et al, 2016; Lu et al, 2008; Accorinte et al, 2005β; Demarco et al, 2001).

### **3. Στρες του ενδοπλασματικού δικτύου**

Σε όλους τους ζώντες οργανισμούς η αναδίπλωση των πρωτεϊνών αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα στάδια στην πολύπλοκη διαδικασία της ολοκλήρωσης της πρωτεϊνικής δομής και λειτουργίας. Για το λόγο αυτό τα κύτταρα έχουν αναπτύξει και τελειοποιήσει έναν μηχανισμό, ο οποίος εκτός από τη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών, περιλαμβάνει και την αντιμετώπιση των τυχών λαθών στην πορεία της διαδικασίας. Όλες οι πρωτεΐνες ενός ευκαρυωτικού κυττάρου που πρόκειται να εκκριθούν ή έχουν προορισμό την κυτταρική μεμβράνη (περίπου το 30% του συνόλου των πρωτεϊνών), μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης των πολυπεπτιδικών τους αλυσίδων ελέγχονται στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο (ΕΔ) πριν προχωρήσουν στη συσκευή Golgi. Επομένως, πραγματοποιείται όχι μόνο η σύνθεση αλλά και η αναδίπλωση και η τροποποίηση των παραπάνω πρωτεϊνών κάτω από τον συνεχή «Ποιοτικό Έλεγχο». Πρόκειται για ένα μηχανισμό με τον οποίο ανιχνεύονται οι μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, για τις οποίες, είτε θα ενεργοποιηθεί η διαδικασία διόρθωσης της αναδίπλωσής τους στο ΕΔ, μέσω της σύνδεσής τους με πρωτεϊνικούς συνοδούς, μόρια γνωστά ως chaperones, είτε θα ενεργοποιηθεί ο

μηχανισμός που θα οδηγήσει τις μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες στην αποδόμηση. Η αποδόμηση θα πραγματοποιηθεί είτε στα πρωτεασώματα, με μια διαδικασία που ονομάζεται «Αποδόμηση σχετιζόμενη με ΕΔ» (ER-associated degradation, ERAD), είτε μέσω της αυτοφαγίας (Kaufman, 2002; Malhotra & Kaufman, 2007(b)).

Η επιτυχής αναδίπλωση των πρωτεϊνών στο ΕΔ εξαρτάται από τις κατάλληλες περιβαλλοντικές και μεταβολικές συνθήκες καθώς και από το γενετικό υπόβαθρο του οργανισμού. Από την άλλη, οι συνθήκες εκείνες που διαταράσσουν τη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών είναι απειλητικές για την ίδια τη ζωή του κυττάρου και κατ' επέκταση του οργανισμού (Anelli & Sitia, 2008; Malhotra & Kaufman, 2007; Malhotra et al, 2008). Οι ενδογενείς συνθήκες στο ΕΔ είναι περισσότερο οξειδωτικές σε σχέση με το κυτταρόπλασμα και είναι αυτές που προωθούν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών, κυρίως μέσω σχηματισμού των δισουλφιδικών δεσμών από ισομεράσες με οξειδοαναγωγική δραστηριότητα, όπως η PDI (Protein Disulfide Isomerases) (Ushioda et al, 2011). Ο μη σωστός σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών οδηγεί στη δημιουργία συσσωματωμάτων από κλάσματα μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και τη συσσώρευσή τους στο ΕΔ. Ενδογενείς πρωτεΐνες του ΕΔ, όπως η BiP και η Grp94, δεσμεύουν τα τμήματα των μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, αποτρέποντας έτσι τη συσσωμάτωσή τους. Το ΕΔ αποτελεί επιπλέον τη βασική αποθήκη ιόντων  $Ca^{+2}$  του κυττάρου, απαραίτητου για την ομαλή λειτουργία του ΕΔ και των πρωτεϊνικών συνοδών. Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών αποτελεί μια ενεργοβόρα διαδικασία, για την οποία το ATP είναι το βασικό ενεργειακό νόμισμα, και επομένως σε συνθήκες ενεργειακής ανεπάρκειας η όλη διαδικασία διαταράσσεται. Το ATP είναι απαραίτητο τόσο για τη διατήρηση της ομοιόστασης του  $Ca^{+2}$  και του οξειδωτικού δυναμικού στο ΕΔ, όσο και για τη λειτουργία των πρωτεϊνικών συνοδών και της ERAD. Εκτός από το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών, οι πρωτεΐνες που εισέρχονται στο ΕΔ υπόκεινται σε μια σειρά από πολλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η γλυκοζυλίωση (N-linked glycosylation), η προσθήκη OH- ομάδων σε αμινοξέα όπως προλίνη και το ασπαρτικό οξύ, η προσθήκη COOH- ομάδων στο γλυταμινικό οξύ κ.α. (Malhotra & Kaufman, 2007(b); Marciniak & Ron, 2006). Όλες αυτές οι διαδικασίες είναι πολύ ευάλωτες σε

οποιοσδήποτε διαταραχές συνθηκών στο περιβάλλον του ΕΔ. Το αποτέλεσμα είναι πολλαπλές περιβαλλοντικές και μεταβολικές αλλαγές να μπορούν να διαταράξουν τη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών, μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν τη διαταραχή της ομοιόστασης  $Ca^{+2}$ , αλλαγή στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό, ενεργειακή ανεπάρκεια κ.α. Επιπλέον, η αυξημένη παραγωγή πρωτεϊνών και επομένως οι αυξημένες ανάγκες για την αναδίπλωσή τους μπορούν να οδηγήσουν στην ανεπάρκεια της λειτουργικής ικανότητας του ΕΔ.

Η δυσκολία του ΕΔ να ανταποκριθεί στις μεταβαλλόμενες συνθήκες οδηγεί, όπως προαναφέρθηκε, στη συσσώρευση των μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, φαινόμενο που αποκαλείται στρες του ΕΔ (ER stress), και πυροδοτεί έναν πολύπλοκο μοριακό μηχανισμό αντιμετώπισης του γνωστού ως «Απάντηση του ΕΔ στη Λανθασμένη Αναδίπλωση Πρωτεϊνών» (Unfolded Protein Response, UPR). Η UPR μπορεί να πυροδοτηθεί από μια πληθώρα φυσιολογικών και μη αλλαγών όπως η διαφοροποίηση και η έντονη εκκριτική λειτουργία κυττάρων (π.χ. πλασματοκυττάρων και β-κυττάρων του παγκρέατος), μεταβολικές αλλαγές (π.χ. έλλειψη γλυκόζης), ισχαιμία, μικροβιακή μόλυνση, γονιδιακές μεταλλάξεις κ.α. Ο μηχανισμός UPR περιλαμβάνει μια πληθώρα αντιδράσεων σε όλα τα επίπεδα γονιδιακής ρύθμισης καθώς και την αποδόμηση των μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών ή ακόμα και την απόπτωση του κυττάρου, όπως στην περίπτωση χρόνιας ενεργοποίησης του UPR. Ο τελικός σκοπός είναι η αποκατάσταση της ομαλής λειτουργίας στο ΕΔ.

Η παραγωγή των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στο κύτταρο σχετίζεται άμεσα με την ανεπάρκεια της λειτουργίας του ΕΔ. Όλο και περισσότερα δεδομένα υπάρχουν πλέον που συσχετίζουν τα αυξημένα επίπεδα των ελεύθερων ριζών με την ανεπάρκεια του ΕΔ και το στρες του ΕΔ. Οι οξειδωτικές διαδικασίες καταβολισμού που πραγματοποιούνται στο κύτταρο έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου ως παραπροϊόντων, επειδή και το  $O_2$  αποτελεί τον κυριότερο δέκτη ηλεκτρονίων κατά τις καταβολικές αντιδράσεις. Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με όλα τα βασικά μακρομόρια του κυττάρου προκαλώντας βλάβες και για το λόγο αυτό όλες οι αερόβιες μορφές ζωής έχουν αναπτύξει πολύπλοκους

αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς προστασίας από τις τοξικές επιδράσεις των ελεύθερων ριζών (Betteridge, 2000). Σε οποιαδήποτε όμως περίπτωση διαταραχής της ισορροπίας μεταξύ των οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών σε βάρος των δεύτερων, προκαλείται το λεγόμενο οξειδωτικό στρες. Η διαταραχή κατά το οξειδωτικό στρες της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας στο ΕΔ, θα οδηγήσει στη διαταραχή της ομοιόστασής του και το επακόλουθο στρες του ΕΔ (Malhotra & Kaufman, 2007).

### **3.1 Ποιοτικός Έλεγχος και αναδίπλωση πρωτεϊνών στο ΕΔ**

Όπως προαναφέρθηκε, η ομαλή λειτουργία της ορθής αναδίπλωσης και της διακίνησης των πρωτεϊνών στο ΕΔ υπόκειται σε πολύπλοκο μηχανισμό Ποιοτικού Ελέγχου. Οι δύο πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους οι πρωτεϊνικοί συνοδοί ελέγχουν την αναδίπλωση είναι είτε μέσω των εκτιθέμενων υδρόφοβων περιοχών στη δομή της λανθασμένα αναδιπλωμένης πρωτεΐνης, είτε μέσω του αυξημένου επιφανειακού δυναμικού που συνοδεύει τις μερικώς αναδιπλωμένες πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη συνοδός BiP προσδέεται στις υδρόφοβες εκτιθέμενες περιοχές των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, ενώ το μη φυσιολογικό - αυξημένο - επιφανειακό δυναμικό αναγνωρίζεται από την UGT1 γλυκοζυλοτρανσφεράση. Οι πρωτεΐνες που δεν κατάφεραν να αποκτήσουν την επιθυμητή δομή με τον παραπάνω μηχανισμό υπόκεινται σε αποδόμηση στα πρωτεασώματα (Molinari, 2007; Malhotra & Kaufman, 2007(b)).

### **3.2 Η απάντηση του ΕΔ στη λανθασμένη αναδίπλωση πρωτεϊνών – Unfolded Protein Response, UPR**

Ο προσαρμοστικός μηχανισμός απάντησης στο στρες του ΕΔ περιλαμβάνει τρία επιμέρους μοριακά μονοπάτια, τα οποία ξεκινάνε από τρεις διαφορετικούς αισθητήρες-υποδοχείς στη μεμβράνη του ΕΔ. Από τους τρεις υποδοχείς, οι δύο

έχουν λειτουργία κινάσης και είναι η IRE1 (Inositol Requiring Kinase 1) και η PERK (Double Stranded RNA-activated Protein Kinase-like ER Kinase). Ο τρίτος αισθητήρας είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, γνωστός ως Activating Transcription Factor 6 (ATF6) (Sidrauski & Walter, 1997; Yoshida et al, 2001; 2000).

Η πιο άμεση απάντηση του κυττάρου στο στρες του ΕΔ (μετά από περίπου 30 λεπτά) είναι η παροδική μείωση της μετάφρασης των mRNAs προκειμένου να μειωθεί η εισροή νέων πεπτιδίων στο ΕΔ (Kaufman, 2004). Το ερέθισμα προς αυτή την κατεύθυνση διαμεσολαβείται από τον υποδοχέα PERK, ο οποίος, αφού διμεριστεί, αυτοφωσφορυλιώνεται χιαστί και φωσφορυλιώνει τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης στα ευκαρυωτικά κύτταρα, eIF2α. Η φωσφορυλίωση του eIF2α οδηγεί στην αναστολή του παράγοντα eIF2B, υπευθύνου για τη μεταφορά GTP στον παράγοντα eIF2 για την ενεργοποίησή του. Το σύστημα eIF2-GTP-tRNA<sup>Met</sup> είναι απαραίτητο για την έναρξη της μετάφρασης και επομένως, η αναστολή του σχηματισμού του οδηγεί στη μαζική αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης (Harding et al, 2000; Scheuner et al, 2001). Ωστόσο, παρά τη μαζική αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης, η ενεργοποίηση του PERK και η φωσφορυλίωση του eIF2α επιτρέπουν την ενεργοποίηση της μετάφρασης ορισμένων mRNAs, όπως το mRNA που κωδικοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα ATF4. Ο ρυθμιστικός άξονας PERK/eIF2α/ATF4 ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων μέσω των οποίων θα δοθεί η κατάλληλη απάντηση του κυττάρου στο οξειδωτικό στρες (Harding et al, 2003; Scheuner et al, 2001; Ron, 2002).

Ο μεταγραφικός παράγοντας ATF6 είναι μία από τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες, η οποία προσδένεται στο στοιχείο ERSE1 (ER stress responsive element) του υποκινητή των γονιδίων που συμμετέχουν στην UPR. Δύο ισομορφές του ATF6 έχουν βρεθεί σε θηλαστικά, οι ATF6α και ATF6β. Σε φυσιολογικές συνθήκες ηρεμίας, ο ATF6 βρίσκεται στη μεμβράνη του ΕΔ, προσδεμένος στην πρωτεΐνη BiP. Στην περίπτωση στρες του ΕΔ, η αποδέσμευση του ATF6 από την BiP οδηγεί στη μετατόπισή του στο σύμπλεγμα Golgi, όπου η πρωτεΐνη διασπάται (Haze et al, 1999; Ye et al, 2000). Οι επεξεργασμένες μορφές των ATF6α και ATF6β στη συνέχεια μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου προσδένονται στις αλληλουχίες υποκινητή CRE και ERSE-1 για την



ενεργοποίηση γονιδίων απαραίτητων για την κατάλληλη απάντηση στο στρες. Μεταξύ των γονιδίων που ενεργοποιούνται μέσω του μονοπατιού ATF6 είναι εκείνα που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες συνοδούς και απόπτωσης, όπως η CHOP (Okada et al, 2002). Η ενεργοποίηση του μοριακού αυτού μηχανισμού, και ιδιαίτερα η μεταγραφή γονιδίων, απαιτούν ορισμένο χρόνο. Επομένως, αν και η αποδέσμευση του ATF6 από την BiP πραγματοποιείται άμεσα, η ολοκληρωμένη απάντηση παρουσιάζει κάποια καθυστέρηση, σε σχέση με τη άμεση αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσω της PERK.

Ο υποδοχέας IRE1 στη μεμβράνη του ΕΔ έχει βρεθεί ότι εκτός από τη λειτουργία κινάσης έχει και δραστηριότητα ριβονουκλεάσης. Η συσσώρευση λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ΕΔ οδηγεί στην αποδέσμευση του IRE1 από την BiP, στο διμερισμό και την αυτοφωσφορυλίωσή του, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της δραστηριότητας της ριβονουκλεάσης, υπεύθυνης για το μάτισμα του XBP1 mRNA. Η μετάφραση του XBP1 mRNA θα οδηγήσει στο σχηματισμό ενεργού μεταγραφικού παράγοντα XBP1 (Yoshida et al, 2001; Calton et al, 2002; Lee et al, 2002). Ο XBP1 παίζει έναν από τους σημαντικότερους ρόλους στην επαγωγή έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στην UPR (Yoshida et al, 2003). Ο μοριακός αυτός μηχανισμός ίσως παρουσιάζει τη μεγαλύτερη καθυστέρηση στην ολοκλήρωσή του.

Η UPR βασίζεται στη θετική και αρνητική ανατροφοδότηση προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι δε θα είναι ούτε υπερβολική αλλά ούτε και ανεπαρκής. Δύο βασικοί αρνητικοί ανατροφοδοτικοί μηχανισμοί στο μονοπάτι της PERK διαμεσολαβούνται από GADD34 και p58<sup>IPK</sup>. Η έκφραση της GADD34 αυξάνεται με την ενεργοποίηση της PERK και φαίνεται να ελέγχεται από την ATF4. Η GADD34 σχετίζεται με την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1), η οποία αποφωσφορυλιώνει την eIF2α (της οποίας η φωσφορυλιωμένη μορφή είναι υπεύθυνη για την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης) και άρα προάγει τη μετάφραση της ίδιας της GADD34 (Novoa et al, 2001; 2003; Ma & Hendershot, 2003). Η έκφραση της p58<sup>IPK</sup> επίσης αυξάνεται κατά το στρες του ΕΔ. Η p58<sup>IPK</sup> αλληλεπιδρά με την PERK αναστέλλοντας τη φωσφορυλίωση και την ενεργότητά της. Επειδή η επαγωγή της p58<sup>IPK</sup> πραγματοποιείται σχετικά αργότερα κατά την UPR και επειδή δρα αναστέλλοντας το

μονοπάτι της PERK, φαίνεται ότι ο ρόλος της είναι ο τερματισμός της UPR όταν πλέον δεν υπάρχουν οι συνθήκες στρες του ΕΔ (Yan et al, 2002; van Huizen et al, 2003). Η p58<sup>IPK</sup> συναντάται και στο μονοπάτι της ενεργοποίησης της IRE1 υποδηλώνοντας ότι ο έλεγχος της UPR μεταφέρεται κάποια στιγμή από τον έλεγχο των PERK και ATF6, που ενεργοποιούνται νωρίς, στην IRE1 που ενεργοποιείται αργότερα (Lee et al, 2003).

Εκτός από την αρνητική ανατροφοδότηση, υπάρχει και θετική ανατροφοδότηση στη λειτουργία της UPR, η οποία εξασφαλίζει τη συνέχεια της λειτουργίας UPR αν το στρες επιμένει. Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, αν και η ATF6 μαζί με τον NF- $\kappa$ B ο οποίος εκφράζεται συνεχώς, επάγουν την έκφραση του γονιδίου για XBP1, η πρωτεΐνη XBP1 μπορεί να επάγει επίσης την έκφραση του γονιδίου XBP1 χωρίς τον NF- $\kappa$ B. Έτσι δημιουργείται θετική αυτο-ανατροφοδότηση, η οποία διατηρεί τη σηματοδότηση μέσω της οδού IRE1 ακόμα και αν οι PERK και η ATF6 οδοί αναστέλλονται. Η ικανότητα της XBP1 να προσδένεται στην ίδια θέση στον υποκινητή μαζί με ATF6 και NF- $\kappa$ B, οδηγεί στην υπόθεση ότι στο χρόνιο στρες, ο έλεγχος της έκφρασης πολλών γονιδίων που συμμετέχουν στην UPR μετατοπίζεται από την ATF6 στην XBP1 (Rutkowski & Kaufman, 2004).

### **3.3 Η πρωτεΐνη ERdj5**

Η ERdj5 περιγράφηκε για πρώτη φορά το 2003 ως μια από τις πρωτεΐνες που παίζει σημαντικό ενισχυτικό ρόλο στον μηχανισμό της αποδόμησης των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (ERAD) σε συνεργασία με την EDEM1 και την BiP (Cunnea et al, 2003). Αποτελεί μέλος της οικογένειας Hsp40 (Heat shock proteins) με επτά πρωτεΐνες (ERdj1-7) που εντοπίζονται στο ΕΔ. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Hsp40 χαρακτηρίζονται από την παρουσία της περιοχής J στη δομή τους και λειτουργούν ως συν-συνοδές πρωτεΐνες (co-chaperones) για τις πρωτεΐνες της οικογένειας Hsp70, στην οποία ανήκει η BiP. Οι πρωτεΐνες ERdj1-7 έχουν διαφορετικούς ρόλους στο ΕΔ. Οι ERdj1, -2, -4 και -7 είναι διαμεμβρανικές και εντοπίζονται στη μεμβράνη του ΕΔ, ενώ οι ERdj3, -5 και -6 εντοπίζονται μέσα στο ΕΔ.

Οι ERdj1-2 διευκολύνουν την είσοδο των πρωτεϊνών στο ΕΔ ενώ τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας επάγονται σε συνθήκες στρες του ΕΔ.

Η ERdj5 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον τόσο λόγω του ρόλου της, όσο και της χαρακτηριστικής δομής της. Είναι καλά διατηρημένη πρωτεΐνη σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (Hosoda et al, 2003). Η δομή της περιλαμβάνει τη χαρακτηριστική για την οικογένεια Hsp40 πρωτεϊνών περιοχή J στο N-τελικό άκρο. Η περιοχή J περιέχει την αλληλουχία αμινοξέων HPD (His-Pro-Asp), η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση της ERdj5 με την BiP. Η αλληλεπίδραση της J περιοχής με την BiP οδηγεί στην ενεργοποίηση της ATPάσης της BiP και την υδρόλυση του ATP σε ADP. Ο παράγοντας NEF (Nucleotide Exchange Factor) επαναφέρει την BiP στην αρχική της μορφή (συνδεμένη με ATP) ολοκληρώνοντας έτσι τον κύκλο και ρυθμίζοντας την ενεργότητα της BiP σε ό,τι αφορά στην σύνδεσή της με τις λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες. Ένα άλλο χαρακτηριστικό της δομής της ERdj5 είναι η παρουσία στη δομή της τεσσάρων περιοχών θειορεδοξίνης (Trx1-4), με λειτουργικότητα PDI (Protein Disulfide Isomerase), στις οποίες οι διαφορετικές αλληλουχίες Cys-X-X-Cys (CXXC) είναι υπεύθυνες για την οξειδοαναγωγική δράση των Trx και τον ισομερισμό των δισουλφιδικών δεσμών (Cunnea et al, 2003). Η εντόπιση της περιοχής J και των Trx στην ίδια πεπτιδική αλυσίδα φαίνεται να ευνοεί την ενζυμική δράση της ERdj5 σε ό,τι αφορά στην αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών στις λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες και στην επακόλουθη μεταφορά τους στην BiP. Εκτός από τις βασικές τέσσερις Trx περιοχές, η ERdj5 φαίνεται να περιέχει επιπλέον δύο Trx περιοχές (Trxb1-2), χωρίς οξειδοαναγωγική αλληλουχία CXXC. Οι δεσμοί υδρογόνου και ιοντικοί δεσμοί που σχηματίζονται μεταξύ των παραπάνω έξι Trx περιοχών σταθεροποιούν την τεταρτοταγή δομή της ERdj5 (Hagiwara et al, 2011). Για την ενίσχυση του μηχανισμού της ERAD, έχει φανεί ότι δεν απαιτείται η ταυτόχρονη δράση και των τεσσάρων Trx. Η οξειδοαναγωγική δράση των CXXC περιοχών των Trx3 και Trx4, που βρίσκονται στο C-τελικό άκρο, φαίνεται να επαρκεί, δεδομένου ότι η CXXC αλληλουχία στην Trx2 επικαλύπτεται από την J περιοχή με αποτέλεσμα την αναστολή της δραστηριότητάς της, ενώ η CXXC αλληλουχία στην Trx1 δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο. Η αλληλεπίδραση της ERdj5 με την EDEM1 πραγματοποιείται στο C-τελικό άκρο της, όπου βρίσκονται

δραστικές Trx3 και Trx4. Ίσως αυτό να εξηγεί τον μη καθοριστικό ρόλο της Trx1 στην ERAD, τουλάχιστον στο βαθμό που η ERAD σχετίζεται με την EDEM1, αφού η θέση της Trx1 στο N-τελικό άκρο δεν σχετίζεται με τη θέση πρόσδεσης της EDEM1 (Hagiwara et al, 2011).

Με βάση την παραπάνω δομή έχει προταθεί ο πιθανός μηχανισμός δράσης της ERdj5. Σύμφωνα με αυτό, η πρωτεΐνη EDEM1 αναγνωρίζει επιλεκτικά τις πρωτεΐνες οι οποίες μετά από επαναλαμβανόμενες προσπάθειες στον κύκλο CNX/CRT δεν αναδιπλώθηκαν σωστά. Στην περίπτωση αυτή η EDEM1 προσδένεται στο C-τελικό άκρο της ERdj5, η οποία με τη σειρά της ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς της πρωτεΐνης που στρατολογείται από την EDEM1. Στο σημείο αυτό στρατολογείται και η BiP, η οποία προσδένεται στην περιοχή J της ERdj5. Η ERdj5 αυξάνει τη δραστικότητα ATPάσης της BiP, απαραίτητη για τη μεταφορά του συμπλέγματος ERdj5/EDEM1/πρωτεΐνης τόσο στη μεμβράνη του ΕΔ όσο και μέσω διαμεμβρανικών καναλιών μεταφοράς (retrotranslocation channels) στα πρωτεασώματα για αποδόμηση (Ushioda & Nagata, 2011; Hagiwara et al, 2011).

### **3.4 Απόπτωση σχετιζόμενη με το στρες του ΕΔ**

Η απάντηση του κυττάρου στο στρες του ΕΔ μπορεί να σχετίζεται και με την ενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών μηχανισμών, αν και ο μηχανισμός δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Σε γενικές γραμμές, η απόπτωση ενός κυττάρου μπορεί να ενεργοποιηθεί είτε εξαιτίας εξωτερικών παραγόντων, τα οποία επιδρούν στους υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του κυττάρου, είτε εξαιτίας εσωτερικών αλλαγών στο κύτταρο. Υπό την επίδραση εξωτερικών αλλαγών, ο αποπτωτικός μηχανισμός του κυττάρου, εφόσον ενεργοποιείται, συμπεριλαμβάνει κυρίως το μονοπάτι ενεργοποίησης της κασπάσης 8. Οι εσωτερικές ωστόσο μεταβολές που μπορεί να προκαλέσουν την απόπτωση, όπως π.χ. βλάβη του DNA, θα οδηγήσουν στην ενεργοποίηση διαφορετικών μηχανισμών, κυρίως αυτών που διαμεσολαβούνται από τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2. Η αναστολή των αντι-αποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl-2 θα οδηγήσει στην επικράτηση των προ-

αποπτωτικών μελών, όπως Bak, Bax αλλά και άλλων πρωτεϊνών, τα οποία με τη σειρά τους θα επάγουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c διαμέσου της μεμβράνης μιτοχονδρίων στο κυτταρόπλασμα. Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c θα οδηγήσει με τη σειρά της στο σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ Araf-1 και προκασπάσης-9, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κασπάσης-9. Η ενεργοποίηση της κασπάσης-9 θα επάγει την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 (η οποία ενεργοποιείται και από την κασπάση-8), η οποία και θα παίξει το βασικό εκτελεστικό ρόλο στο θάνατο του κυττάρου. Το ποιο από τα δύο προαναφερθέντα αποπτωτικά μονοπάτια ακολουθούνται περισσότερο κατά το στρες του ΕΔ, δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα, αφού η υπερκάλυψή τους είναι δεδομένη. Κύτταρα Araf-1<sup>-/-</sup> που δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν την κασπάση-9 μέσω απελευθέρωσης κυτοχρώματος-c, μπορούν ωστόσο να ενεργοποιήσουν κασπάση-9 και -3 ως απάντηση στο στρες του ΕΔ (Rao et al, 2002).

Εξάλλου, η κασπάση-9 μπορεί να ενεργοποιηθεί, ανεξαρτήτως από το μονοπάτι που περιλαμβάνει το κυτόχρωμα-c και Araf-1, από την κασπάση-12, η οποία είναι ειδική της απόπτωσης σχετιζόμενης με στρες του ΕΔ. Η κασπάση-12 βρίσκεται στη μεμβράνη του ΕΔ όπου αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες IRE1 και TRAF2 (Yoneda et al, 2001, Morishima et al, 2002). Στρες του ΕΔ οδηγεί στην απελευθέρωση της κασπάσης-12 από το σύμπλοκο με το TRAF2, το διμερισμό και την ενεργοποίησή της, πιθανόν με τη διαμεσολάβηση της πρωτεάσης calpain (Tan et al, 2006). Ο ρόλος της κασπάσης-12 στην απόπτωση σχετιζόμενη με UPR, αν και δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, φαίνεται από το γεγονός ότι τα κύτταρα χωρίς κασπάση (κασπάση-12<sup>-/-</sup>) παρουσιάζουν σχετική αντίσταση στην απόπτωση που ενεργοποιείται από στρες του ΕΔ. Το γεγονός ότι τα κύτταρα αυτά οδηγούνται, παρόλα αυτά, στην απόπτωση υποδηλώνει ότι άλλοι μηχανισμοί, εκτός εκείνου μέσω της κασπάσης-12, μπορούν να αναπληρώνουν την έλλειψή της (Nakagawa et al, 2000).

Η αλληλεπίδραση των IRE1 και TRAF2, η οποία ελέγχεται από το επίπεδο του στρες στο ΕΔ, σχετίζεται επίσης, εκτός από την ενεργοποίηση της κασπάσης-12, και με την ενεργοποίηση των ASK1 και JNK, μόρια που παίζουν σημαντικό ρόλο στους προ-αποπτωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου, όπως η απελευθέρωση του

κυτοχρώματος-c (Nishitoh et al, 2002). Συγκεκριμένα, IRE1 και TRAF2 αλληλεπιδρούν με την ASK1, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την JNK, μηχανισμός στην ενεργοποίηση του οποίου συμβάλλουν και άλλοι παράγοντες, όπως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και ο TNFα (Tobiume et al, 2002; Hu et al, 2006).

Η απόπτωση του κυττάρου σχετιζόμενη με το στρες του ΕΔ έχει επίσης σχέση με την ομοιοστάση του  $Ca^{+2}$  στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια και στο ΕΔ. Η ρύθμιση του  $Ca^{+2}$  σχετίζεται και με την ενεργοποίηση της κασπάσης-12, η οποία, όπως αναφέρθηκε, διαμεσολαβείται από την πρωτεάση calpain, της οποίας η λειτουργία εξαρτάται από τη συγκέντρωση  $Ca^{+2}$  (Nakagawa & Yuan, 2000). Ο μηχανισμός με τον οποίο το  $Ca^{+2}$  απελευθερώνεται από το ΕΔ κατά την UPR δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα, αν και έχουν προταθεί διάφορες πρωτεΐνες που μπορεί να συμμετέχουν. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, και συγκεκριμένα της υπο-οικογένειας BH3-only πρωτεϊνών όπως οι Bax, Bad και Bak. Κατά το στρες του ΕΔ οι παραπάνω πρωτεΐνες υφίστανται δομικές αλλαγές, συνήθως ολιγομερισμό, στην επιφάνεια του ΕΔ με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του  $Ca^{+2}$  και την ενεργοποίηση της κασπάσης-12 στο ΕΔ (Zong et al, 2003). Το  $Ca^{+2}$  που απελευθερώνεται προσλαμβάνεται στα μιτοχόνδρια, στις περιοχές που βρίσκονται σε στενή σχέση με το ΕΔ, γεγονός που οδηγεί στη διαταραχή του δυναμικού της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων που έχει συνδεθεί με την ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης, μέσω απελευθέρωσης του κυτοχρώματος-c και της ενεργοποίησης μοριακού μηχανισμού απόπτωσης που περιλαμβάνει Araf-1 και προ-κασπάση-9 (Filippin et al, 2003).

Άλλα μέλη της οικογένειας Bcl-2, με αντι-αποπτωτικές ιδιότητες αντισταθμίζουν τη δράση των BH3-only πρωτεϊνών. Η θέση των πρωτεϊνών αυτών στη μεμβράνη μιτοχονδρίων ή του ΕΔ έχει σημασία στη δράση τους και φαίνεται να μεταβάλλεται υπό την επίδραση στρες του ΕΔ. Η ίδια Bcl-2, η οποία συναντάται στη μεμβράνη και των μιτοχονδρίων και του ΕΔ, κατά την UPR μεταφέρεται μόνο στη μεμβράνη του ΕΔ, όπου μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να μπλοκάρει την προ-αποπτωτική δράση των BH3-only πρωτεϊνών (Häcki et al, 2000; Annis et al, 2001). Η αρνητική ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής της Bcl-2 πραγματοποιείται από τον προ-αποπτωτικό

μεταγραφικό παράγοντα CHOP, ο οποίος αναστέλλει τη μεταγραφή του γονιδίου για Bcl-2. Η έκφραση του CHOP αυξάνεται υπό την επίδραση των ATF4 και ATF6/PERK που ενεργοποιούνται κατά την UPR, και έτσι πιθανόν να παίζει ρόλο στη μετάβαση από την UPR (που θα οδηγήσει στην επιβίωση του κυττάρου) στην ενεργοποίηση προ-απόπτωτικών μηχανισμών (McCullough et al, 2001; Rutkowski & Kaufman, 2004). Η δράση της CHOP, αν και παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστη, θεωρείται από τις πιο καθοριστικές στη απόπτωση σχετιζόμενη με στρες του ΕΔ. Η έκφρασή του σχετίζεται με τα επίπεδα του στρες και τη διάρκειά του. Έχει φανεί ότι χρόνια έκθεση σε ήπιο στρες μπορεί να οδηγήσει στην αναστολή της έκφρασης του CHOP, μέσω της αποδόμησης του mRNA και της πρωτεΐνης CHOP (Malhotra & Kaufman, 2007).

#### **4. Δομή και ρόλος του TGFβ στο σύμπλεγμα οδοντίνης-πολφού**

Η υπερ-οικογένεια των αυξητικών παραγόντων μετασχηματισμού β (Transformed Growth Factors β, TGFβ) περιλαμβάνει περίπου 40 μέλη, τα οποία παρουσιάζουν δομική ομολογία και υποδιαιρούνται σε τέσσερις βασικές οικογένειες: TGFβ, BMP, Activins και GDF (Heldin et al, 1997).

Η οικογένεια του TGFβ απαριθμεί πέντε μέλη, τα TGFβ1-5. Από αυτά οι TGFβ1-3 συναντώνται στα θηλαστικά (Pelton et al, 1990) και παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ομολογία (70% ανάμεσα TGFβ1 και TGFβ2 και 70-75% ανάμεσα TGFβ1,-2,-3 (Cheifetz et al, 1987; Jakowlew et al, 1988). Κωδικοποιούνται από το ίδιο γονίδιο αλλά η έκφρασή τους ελέγχεται από διαφορετικούς υποκινητές, γεγονός που ίσως εξηγεί τη διαφορετική έκφρασή τους, τόσο ανάλογα με τον ιστό στο οποίο δρουν, όσο και ανάλογα με τη χρονική στιγμή δράσης τους. Συμμετέχουν σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό στον έλεγχο της διαφοροποίησης των κυττάρων (επαγωγή ή αναστολή), στην επαγωγή ή την αναστολή της αύξησης των κυττάρων (αναστολή αύξησης κυρίως για επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα και επαγωγή της αύξησης στα μεσεγχυματικά κύτταρα), στη μορφογένεση, στην αγγειογένεση και την απόπτωση. Έχουν περισσότερο ανασταλτική δράση στα αμυντικά κύτταρα, η οποία

αφορά τόσο στην αύξηση όσο και στη διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών (Piek et al, 1999; Letterio & Roberts, 1998).

#### **4.1 Δομή και έκκριση του TGFβ**

Ένας από τους βασικούς μηχανισμούς ελέγχου της δράσης του TGFβ βασίζεται στο εάν ο TGFβ βρίσκεται σε ενεργή ή ανενεργή μορφή. Οι ισομορφές του TGFβ αρχικά μεταφράζονται ως μεγάλα προ-πρόδρομα μονομερή, με μια υδρόφοβη αλληλουχία SP στο αμινοτελικό άκρο. Το προ-πρόδρομο μόριο υπόκειται σε μια σειρά ενδοκυτταρικών ενζυμικών τροποποιήσεων, όπως η πρωτεολυτική απομάκρυνση του SP και η πρωτεολυτική διάσπαση από την ενδοπεπτιδάση φουρίνη. Με τη διάσπαση αυτή προκύπτουν δύο μονομερή μόρια, καθένα από τα οποία σχηματίζει διμερή σύμπλοκα με όμοιά του προϊόντα διάσπασης. Το διμερές σύμπλοκο από το αμινοτελικό άκρο του πρόδρομου μορίου είναι ανενεργό (Latency-associated Peptide, LAP). Το διμερές σύμπλοκο από το καρβοξυλικό άκρο του πρόδρομου μορίου είναι το ενεργό, ώριμο μόριο TGFβ (mature TGFβ). Οι δύο πεπτιδικές αλυσίδες του ώριμου TGFβ είναι ενωμένες μεταξύ τους με υδρόφοβους δεσμούς και μια δισουλφιδική γέφυρα. Ένα χαρακτηριστικό σημείο για όλους τους TGFβ είναι ότι, παρά τη διάσπαση του πρόδρομου μορίου, τα διμερή σύμπλοκα από το αμινοτελικό άκρο (LAP) παραμένουν ενωμένα με τα διμερή σύμπλοκα από το καρβοξυλικό άκρο (ώριμο TGFβ) με μη ομοιοπολικούς δεσμούς. Η σύνδεση αυτή, η οποία διευκολύνει την ενδοκυττάρια κίνηση του TGFβ, είναι που καθιστά τον TGFβ μη ενεργό (Herpin et al, 2004; Hyttiäinen et al, 2004). Όταν το τμήμα LAP-TGFβ είναι συνδεδεμένο με την πρωτεΐνη LTBP (Latency Binding Protein), το σύμπλοκο που προκύπτει αναφέρεται ως Μεγάλο Ανενεργό Σύμπλοκο του TGFβ (Large Latent TGFβ) και αυτή είναι η μορφή με την οποία ο TGFβ εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο (Herpin et al, 2004).

Ο TGFβ εκκρίνεται από το κύτταρο ως σύμπλοκο αποτελούμενο από TGFβ, LAP και LTBP. Αν το ώριμο TGFβ ελευθερωθεί από το τμήμα LAP και δεν προσδεθεί στους κυτταρικούς υποδοχείς, απομακρύνεται από τον εξωκυττάριο χώρο, είτε με



ενδοκύττωση, είτε μέσω κυκλοφορίας. Επίσης μπορεί να προσδεθεί μέσω της LTBP στη ντεκορίνη, τη φιβρονεκτίνη και το κολλαγόνο τύπου IV της εξωκυττάριας μήτρας, με αποτέλεσμα είτε να ενισχύεται η παρουσίασή του στους υποδοχείς του, συνεπώς και η δράση του, είτε να απενεργοποιείται.

Το τμήμα LAP μπορεί να απομακρυνθεί από τον TGFβ, οπότε να απελευθερωθεί η δραστική μορφή του TGFβ, με την πρωτεολυτική δράση των μεταλλοπρωτεϊνών MMP2. Επίσης, υπό την επίδραση διαφόρων παραγόντων (π.χ. ουρία, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, ένζυμα) η στερεοδιαμόρφωση του LAP μπορεί να αλλάξει με τέτοιο τρόπο που, χωρίς να γίνει η αποδέσμευση του TGFβ, να αποκαλυφθούν στο μόριο οι θέσεις πρόσδεσης με τους υποδοχείς του (Hygitiäinen et al, 2004).

#### **4.2 Υποδοχείς του TGFβ**

Η μετάδοση του σήματος από τον TGFβ ξεκινά όταν ο τελευταίος συνδεθεί με τους υποδοχείς του στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων στόχων. Οι υποδοχείς του TGFβ (TGFβR) ανήκουν στην οικογένεια των κινασών σερίνης-θρεονίνης, η ενεργοποίηση των οποίων επιτυγχάνεται με τη φωσφορυλίωση αμινοξέων στο κυτταροπλασματικό τους τμήμα. Τρεις διαμεμβρανικοί υποδοχείς έχουν προσδιοριστεί για τον TGFβ: οι TGFβR1 και TGFβR2, οι οποίοι είναι γλυκοπρωτεΐνες και ο TGFβR3, μία β-γλυκάνη που διαφέρει σημαντικά από τους δύο παραπάνω. Όλοι οι TGFβRs, παρουσία και μη του TGFβ, σχηματίζουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ομο- και ετερομερή σύμπλοκα (Lutz & Knaus, 2002). Ο TGFβR2 είναι ειδικός για τον TGFβ. Ο TGFβR1 έχει σχετικά μικρή χημική συγγένεια με τον TGFβ. Η ενεργοποίησή του επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασής του με τον ενεργοποιημένο TGFβR2. Ο TGFβR3 έχει ένα κοντό ενδοκυτταρικό τμήμα και φαίνεται ότι παίζει ρόλο στην παρουσίαση του TGFβ2 στον TGFβR2 (Cheifetz et al, 1987; Wang et al, 1991, Pepin et al, 1996).

Τρεις βασικές περιοχές μπορούν να διακριθούν στους TGFβR: η εξωκυτταρική, η ενδοκυτταρική περιοχή και το διαμεμβρανικό τμήμα. Η εξωκυτταρική περιοχή είναι

σχετικά μικρή και συμβάλλει στην αναδίπλωση του υποδοχέα στην τρισδιάστατη δομή του καθώς και για την πρόσδεση του TGFβ (Cheifetz et al, 1988, Wells et al, 1997; Greenwald et al, 1999). Στο ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα βρίσκεται η καταλυτική περιοχή της κινάσης, υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του υποδοχέα (Wrana et al, 1994).

Για να ενεργοποιηθούν οι δύο υποδοχείς θα πρέπει να σχηματιστεί στην επιφάνεια του κυττάρου σύμπλοκο αποτελούμενο από διμερές TGFβR1 και διμερές TGFβR2 μαζί με διμερές του ώριμου TGFβ. Οι δύο υποδοχείς έχουν χημική συγγένεια μεταξύ τους και σχηματίζουν σύμπλοκα και απουσία του TGFβ. Ωστόσο το σύστημα δεν ενεργοποιείται, χάρη στην πρωτεΐνη FKB12 η οποία προσδένεται στον TGFβR1 εμποδίζοντας τη φωσφορυλίωσή του (Massagué & Chen, 2000). Η πρόσδεση του TGFβ αλλάζει τη στερεοδιάταξη του συμπλέγματος και η FKB12 απομακρύνεται (Chen et al, 1997). Αρχικά ο TGFβ προσδένεται στον TGFβR2, γεγονός που οδηγεί στην φωσφορυλίωση του ενδοκυτταρικού τόπου της κινάσης, αποκαλύπτοντας ταυτόχρονα επίτοπο στον TGFβ για την πρόσδεση του στον TGFβR1 (Massague, 1998; Wrana et al, 1994; Shi & Massagué, 2003).

#### **4.3 Σηματοδότηση του TGFβ - παράγοντες SMAD**

Η ενεργοποίηση του TGFβR1 οδηγεί στη φωσφορυλίωση κυτταροπλασματικών διαμεσολαβητών, πρωτεϊνών γνωστών ως SMAD. Υπάρχουν συνολικά οκτώ SMADs, που ταξινομούνται σε τρεις ομάδες: οι R-SMAD (receptor-regulated SMAD), οι co-SMAD (co-mediator SMAD) και οι I-SMAD (inhibitory SMAD). Στο σηματοδοτικό μονοπάτι των TGFβ συμμετέχουν δύο R-SMAD: οι SMAD2 και -3, μία co-SMAD: η SMAD4 και μία I-SMAD: η SMAD7. Εκτός από την SMAD7, η οποία παρουσιάζει διαφορετική μορφολογία, οι υπόλοιπες SMADs έχουν στο μόριό τους τρεις διακριτές περιοχές, που παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία τους: τη περιοχή MH1 στο αμινοτελικό άκρο, τη περιοχή MH2 στο καρβοξυλικό άκρο και τη συνδετική περιοχή ανάμεσά τους (linker). Σε γενικές γραμμές, η MH1 περιοχή περιέχει αλληλουχίες υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση με το DNA, η MH2 περιοχή αλληλουχίες για την

πρόσδεση με τον TGFβR1 και η συνδετική περιοχή περιλαμβάνει πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης, για την αλληλεπίδρασης με μόρια άλλων σηματοδοτικών οδών (Shi & Massagué, 2003).

Σε συνθήκες ηρεμίας η περιοχή MH1 αλληλοεπιδρά με την περιοχή MH2 αναστέλλοντας τη λειτουργία της πρώτης. Ο TGFβR1 ενεργοποιεί άμεσα τις SMAD2 και -3 (Chen et al, 1998). Οι SMAD2 και -3 βρίσκονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Η φωσφορυλίωσή τους οδηγεί στη δημιουργία συμπλόκου με τη SMAD4, η οποία βρίσκεται τόσο στο κυτταρόπλασμα, όσο και στον πυρήνα. Το σύμπλοκο SMAD2, SMAD3 και SMAD4 μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου. Η SMAD7 βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα και δρα ανασταλτικά στην ενεργοποίηση του όλου μηχανισμού (Suzuki et al, 2002; Herpin et al, 2004). Η έκφραση της SMAD7 υπόκειται σε λεπτό μηχανισμό ρύθμισης. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των R-SMAD και του TGFβR1 διευκολύνεται από την πρωτεΐνη SARA (Smad Anchor for Receptor Activation), η οποία ακινητοποιεί τα SMADs κοντά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, φέρνοντας τα κοντά στον υποδοχέα (Tsukazaki et al, 1998; Wu et al, 2000).

Τρεις πρωτεΐνες, η c-Ski, η SnoN και ο TGIF δρουν ανασταλτικά στη σηματοδότηση του TGFβ. Η c-Ski ανταγωνίζεται τις R-SMAD για την πρόσδεση με την περιοχή MH2 της SMAD4 και διαταράζει τη δημιουργία λειτουργικού συμπλόκου R-SMAD/SMAD4 (Wu et al, 2002). Η SnoN δρα με παρόμοιο μηχανισμό συνδεόμενη με SMAD2 και Smurf2, γεγονός που οδηγεί στην ουβικουϊτίνωση και την αποδόμηση του συμπλόκου SMAD2/SnoN στα πρωτεασώματα (Shi & Massagué, 2003). Η δημιουργία συμπλόκου μεταξύ SMAD2 και μεταγραφικού αναστολέα TGIF (στο μονοπάτι Ras-MEK-MARK) απενεργοποιεί επίσης τη SMAD2 και δρα ανασταλτικά στην εξαρτώμενη από TGFβ έκφραση γονιδίων (Lo et al, 2001).

Η συγκέντρωση των SMADs στον πυρήνα ρυθμίζεται επίσης μέσω της αλληλεπίδρασης μεταξύ του σηματοδοτικού μονοπατιού που ακολουθεί ο TGFβ και του μονοπατιού Ras-MEK-Erk-MAP κινάσης. Η κινάση Erk στο μονοπάτι αυτό, δρα ανασταλτικά στη σηματοδότηση του TGFβ φωσφορυλιώνοντας την SMAD2, γεγονός που με τη σειρά του εμποδίζει τη μεταφορά της στον πυρήνα (Wicks et al, 2000; Shi & Massagué, 2003).

#### 4.4 Ο ρόλος του TGFβ στο σύμπλεγμα πολφού-οδοντίνης

Ο ρόλος του TGFβ κατά την ανάπτυξη του συμπλέγματος πολφού-οδοντίνης και κατά την επούλωσή του μετά από τραύμα έχει αναφερθεί επανειλημμένως στη βιβλιογραφία. Οι δύο μηχανισμοί, εκείνος της ανάπτυξης και εκείνος της επούλωσης, παρουσιάζουν αξιοσημείωτες ομοιότητες μεταξύ τους, γεγονός που επιτρέπει ως ένα βαθμό τη διατύπωση κοινών συμπερασμάτων από τις μελέτες του ενός ή του άλλου. Είναι γνωστό σήμερα ότι ο TGFβ, όπως και άλλοι αυξητικοί παράγοντες, επάγει τη διαφοροποίηση των κυττάρων της οδοντικής θηλής προς οδοντινοβλάστες κατά την ανάπτυξη του δοντιού. Επίσης, επάγει τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων του πολφού προς κύτταρα δίκην-οδοντινοβλαστών κατά την επούλωσή του. Τέλος, παίζει ρόλο στην παραγωγή της εξοκυττάριας μήτρας της οδοντίνης από τις οδοντινοβλάστες και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις.

Ο TGFβ έχει εντοπιστεί στην οδοντίνη ώριμων δοντιών τόσο των ανθρώπων όσο και τρωκτικών. Αρχικά βρέθηκε ότι ο TGFβ1 και -3 είναι οι μόνες ισομορφές που ανιχνεύονται στην οδοντίνη ανθρώπων, ενώ ο TGFβ1 επικρατεί στα τρωκτικά, όπου σε μικρότερες ποσότητες βρέθηκαν και οι TGFβ2 και -3 (Finkelman et al, 1990; Cassidy et al, 1997). Σε μελέτες ωστόσο ανοσοϊστοχημείας και *in situ* υβριδοποίησης στο αναπτυσσόμενο οδοντικό σπέρμα ανθρώπου έχουν εντοπιστεί τα mRNA και των τριών ισομορφών του TGFβ. TGFβ1 mRNA έχει εντοπιστεί στο πρώιμο οδοντικό επιθήλιο και το γύρω μεσέγχυμα, στην οδοντική θηλή και την δικτυωτή στιβάδα του οδοντικού οργάνου στο στάδιο του κυπέλλου, στις προ-αδαμαντινοβλάστες στο στάδιο του κώδωνα και στις ώριμες οδοντινοβλάστες. TGFβ2 mRNA έχει εντοπιστεί στο μεσέγχυμα γύρω από το οδοντικό σπέρμα στο στάδιο του κυπέλλου, στην εν τω βάθει στιβάδα οδοντικού οργάνου, στις προ-αδαμαντινοβλάστες και στις ώριμες αδαμαντινοβλάστες στο στάδιο του κώδωνα, και σε μεταγενέστερα στάδια στις ώριμες οδοντινοβλάστες και τον πολφό. Παρομοίως, ο TGFβ3 mRNA εκφράζεται στο μεσέγχυμα γύρω από το οδοντικό σπέρμα στο στάδιο του κυπέλλου, στην εν τω βάθει στιβάδα οδοντικού οργάνου και αργότερα στις ώριμες οδοντινοβλάστες και σε άλλα κύτταρα στον πολφό. Αξιοσημείωτο είναι ότι το mRNA των ισομορφών του TGFβ δεν εκφράζεται ταυτόχρονα στα κύτταρα του αναπτυσσόμενου σπέρματος. Το

TGFβ1 και -2 mRNA σταματάει να εκφράζεται στις προ-αδαμαντινοβλάστες όταν αρχίζει να εκφράζεται στις εκκριτικές οδοντινοβλάστες, ενώ το TGFβ3 mRNA εκφράζεται μόνο στις εκκριτικές οδοντινοβλάστες (Pelton et al, 1990; Heikinheimo et al, 1993; Bègue-Kirnetal, 1994). Εκτός από το mRNA, έχει προσδιοριστεί και η τοπογραφική έκφραση των πολυπεπτιδίων των TGFβ1-3 σε διάφορα στάδια στο αναπτυσσόμενο δόντι. Ο TGFβ1 εκφράζεται στη δικτυωτή στιβάδα του οδοντικού οργάνου και την οδοντική θηλή στο στάδιο του κυπέλλου, ο TGFβ3 εκφράζεται στις αδαμαντινοβλάστες και την οδοντική θηλή, ενώ ο TGFβ2 παρουσιάζει αυξανόμενη έκφραση στις προ-αδαμαντινοβλάστες από το στάδιο του κυπέλλου έως και στις ώριμες αδαμαντινοβλάστες μετά την έναρξη της παραγωγής οδοντίνης. Από μελέτες σε ποντίκια knock-out για τον TGFβ1 έχει φανεί ότι ο ρόλος του είναι ουσιαστικός για τη μορφολογική και τη λειτουργική διαφοροποίηση των οδοντινοβλαστών (παραγωγή του οργανικού υποστρώματος της οδοντίνης και η μεταλλοποίησή του) (Thyagarajan et al, 2001). Η προσθήκη των TGFβ1, -2 και -3 σε καλλιέργεια με τομές δοντιών επίμυων έδειξε ότι οι TGFβ1 και -3 έχουν επαγωγικό ρόλο στην εκκριτική λειτουργία των οδοντινοβλαστών και επάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της υποοδοντινοβλαστικής στιβάδας. Ειδικά ο TGFβ3 φάνηκε να μπορεί να επάγει τη διαφοροποίηση των κυττάρων της υποοδοντινοβλαστικής στιβάδας σε ώριμες οδοντινοβλάστες (Sloan & Smith, 1999). Ο TGFβ2 συμβάλλει, επίσης, στην εκκριτική λειτουργία των οδοντινοβλαστών, εμπλεκόμενος περισσότερο στον καθορισμό του μεγέθους και του σχήματος του δοντιού. Ο ρόλος του, όμως, δεν φαίνεται να είναι προαπαιτούμενος για την τελική μορφολογική διαφοροποίησή τους (Oka et al, 2007).

Είναι γνωστό ότι η διαφοροποίηση των οδοντινοβλαστών ελέγχεται από τα επιθηλιακής προέλευσης κύτταρα της εν των βάθει στιβάδας του οδοντικού οργάνου και τη βασική μεμβράνη ανάμεσά τους. Η μοριακή δομή της βασικής μεμβράνης περιλαμβάνει πρωτεΐνες χαρακτηριστικές της εξωκυττάριας μήτρας ικανές να δεσμεύουν τον TGFβ, όπως η φμπρονεκτίνη, η ντεκορίνη, η LTBP, το κολλαγόνο τύπου IV και III. Έχει φανεί ότι η έκφραση των παραπάνω μορίων μεταβάλλεται σημαντικά καθώς προχωράει η διαφοροποίηση των οδοντινοβλαστών, ενώ αργότερα ανιχνεύονται στην αδαμαντινοοδοντική ένωση,

που παίρνει τη θέση της βασικής μεμβράνης μετά την ολοκλήρωση της ανάπτυξης του δοντιού (Lesot et al, 2001). Ο ρόλος του TGFβ κατά την αλληλεπίδραση μεταξύ των προ-αδαμαντινοβλαστών και προ-οδοντινοβλαστών διαμέσων της βασικής μεμβράνης διατυπώθηκε για πρώτη φορά στην υπόθεση εργασίας των Bègue-Kirn και συν. και περιλαμβάνει τόσο την παρακρινή όσο και την αυτοκρινή δράση του. Αρχικά φαίνεται ότι ο TGFβ εκκρίνεται από τις προ-αδαμαντινοβλάστες και να δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης. Η απελευθέρωσή του οδηγεί στην αλληλεπίδρασή του με τους υποδοχείς στην επιφάνεια των προ-οδοντινοβλαστών (παρακρινής δράση). Η ενεργοποίηση των υποδοχέων επάγει τη μεταγραφή αυξητικών παραγόντων, ανάμεσα στους οποίους και ο TGFβ, οι οποίοι δρουν συνεργικά στις ίδιες τις προ-οδοντινοβλάστες, ρυθμίζοντας τόσο τη διαφοροποίησή τους όσο και το σχηματισμό της εξωκυττάριας μήτρας που τις περιβάλλει (αυτοκρινής δράση) (Bègue-Kirn et al, 1994).

Στις ώριμες οδοντινοβλάστες αλλά και σε μεσεγχυματικά κύτταρα του πολφού, υγιών και τερηδονισμένων δοντιών, με ανοσοϊστοχημεία και *in situ* υβριδοποίηση, έχουν ανιχνευτεί οι δύο τύποι των υποδοχέων για TGFβ, TGFβR1 και TGFβR2, καθώς και SMAD2, -3 και -4 (Lucchini et al, 2002; Sloan et al, 1999). Η έκφρασή τους ήταν μεγαλύτερη στις οδοντινοβλάστες παρά σε πολφικά κύτταρα τόσο σε υγιή όσο και σε τερηδονισμένα δόντια (Sloan et al, 1999). Όσον αφορά στην έκφραση του mRNA και αυτούς τους υποδοχείς, αυτή ήταν μεγαλύτερη στα πολφικά κύτταρα τερηδονισμένων δοντιών (Sloan et al, 2001). Αύξηση της έκφρασης του TGFβR1 έχει παρατηρηθεί σε κύτταρα δίκην-οδοντινοβλάστης στην επανορθωτική οδοντίνη σε σχέση με τις οδοντινοβλάστες φυσιολογικής οδοντίνης, όπου παρατηρήθηκε επίσης και αυξημένη έκφραση των SMAD2 και -3 (Hwang et al, 2007).

Ο TGFβ που εκκρίνεται από τις ώριμες οδοντινοβλάστες, μετά την ολοκλήρωση της ανάπτυξης, αποθηκεύεται στην εξωκυττάρια μήτρα της οδοντίνης και μπορεί να προσδεθεί στους υποδοχείς του στην επιφάνεια των οδοντινοβλαστών και των κυττάρων του πολφού. Η απομεταλλικοποίηση της οδοντίνης, είτε παρουσία τερηδονογονοπαθογόνων μικροοργανισμών είτε μετά από εφαρμογή οδοντιατρικών υλικών κάλυψης του πολφού ή χηλικών παραγόντων, όπως το EDTA, απελευθερώνει

βιοενεργές ουσίες από την εξωκυττάρια μήτρα, ανάμεσα στις οποίες και ισομορφές του TGFβ (Cassidy et al, 1997; Zhao et al, 2000; Graham et al, 2006). Η παρατήρηση ότι η οδοντίνη δεν είναι αδρανές υλικό αλλά αποτελεί δεξαμενή βιοενεργών παραγόντων, τα οποία μπορούν να απελευθερωθούν, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι παράγοντες αυτοί μπορούν να ενορχηστρώσουν μοριακούς μηχανισμούς κατά την επούλωση του πολφού, οδήγησε τους ερευνητές στην αναζήτηση νέων προσεγγίσεων στη θεραπεία ζωντανού πολφού (Magloire et al, 2001; Smith et al, 2001).

Ο απώτερος σκοπός των θεραπευτικών μεθόδων που αποσκοπούν στην αναγέννηση του συμπλέγματος πολφού οδοντίνης είναι η αποκατάσταση της μορφολογικής και της λειτουργικής συνέχειας στο όριο πολφού-οδοντίνης με την παραγωγή της επανορθωτικής ή/και αντιδραστικής οδοντίνης. Προς την κατεύθυνση αυτή έχουν γίνει μια σειρά *in vivo* και *in vitro* μελετών, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν εξωγενείς και ενδογενείς αυξητικοί παράγοντες, που αφέθηκαν να επιδράσουν στον πολφό, είτε απευθείας είτε διαμέσου εναπομένουσας οδοντίνης. Η εφαρμογή π.χ. συστατικών οδοντίνης μετά την απομεταλλικοποίησή της με EDTA, σε κοιλότητα χωρίς αποκάλυψη του πολφού σε κουνάβια, οδήγησε σε σχηματισμό αντιδραστικής οδοντίνης (Smith et al, 2001). Η ενδοπορφική τοποθέτηση προ-πολυμερισμένου  $\text{Ca(OH)}_2$  εμποτισμένου με ανασυνδυασμένο TGFβ1 ή φίλτρων Millipore με ανασυνδυασμένο TGFβ1 ή συστατικά οδοντίνης μετά την απομεταλλικοποίησή της με EDTA, οδήγησαν στη διαφοροποίηση κυττάρων του πολφού σε κύτταρα δίκην-οδοντινοβλάστης και στο σχηματισμό επανορθωτικής οδοντίνης κοντά στα φίλτρα, όχι όμως και σε απόσταση από αυτά. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει, σύμφωνα με τους ερευνητές, την περιορισμένη επαγωγική δυνατότητα του TGFβ1 σε μεγάλης έκτασης βλάβες του πολφού (Tziafas et al, 1995; 1998). Η άμεση κάλυψη του πολφού ποντικών με μεμβράνη κολλαγόνου εμποτισμένου με TGFβ1 έδειξε σημαντική βελτίωση της επούλωσης μαλακών και σκληρών ιστών, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, μετά από τρεις εβδομάδες (Hu et al, 1998). Άμεση κάλυψη του πολφού δοντιών κασίικας με κόνια φωσφορικού ασβεστίου ενισχυμένη με μικροσφαιρίδια PLGA εμποτισμένα με TGFβ1, οδήγησε, μετά από δώδεκα εβδομάδες, σε σχηματισμό τεταρτοταγούς οδοντίνης και διαφοροποίηση των

κυττάρων του πολφού σε κύτταρα δίκην-οδοντινοβλάστης (Zhang et al, 2008). Άμεση κάλυψη πολφού δοντιών σκύλων με πολυσακχαρική μεμβράνη ενισχυμένη με μικροσφαιρίδια εμποτισμένα με TGFβ1 επίσης οδήγησε σε σχηματισμό τριτοταγούς οδοντίνης, και μάλιστα 3-6 φορές περισσότερο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, στην οποία εφαρμόστηκε μόνο η μεμβράνη χωρίς τον TGFβ1. Στην ίδια μελέτη, η εφαρμογή της μεμβράνης με TGFβ1 σε καλλιέργεια κυττάρων πολφού, ενίσχυσε τη διαφοροποίησή τους σε κύτταρα δίκην-οδοντινοβλάστης σε σχέση με την εφαρμογή μεμβράνης χωρίς τον TGFβ1 (Li et al, 2014). Η τοποθέτηση αλγινικής υδρογέλης εμποτισμένης με TGFβ1 σε τομές δοντιών σε καλλιέργεια είχε ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των πολφικών κυττάρων και παραγωγή οργανικής μήτρας οδοντίνης στην επιφάνεια των τομών (Dobie et al, 2002). Η διάχυση του TGFβ1 διαμέσου σωληνίσκων κολλημένων στις τομές δοντιών σε συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας οδήγησε στην αυξημένη συγκέντρωση πολφικών κυττάρων στην οδοντινοβλαστική και την υπο-οδοντινοβλαστική στιβάδα κοντά στον σωληνίσκο. Παρατηρήθηκε επίσης αυξημένος πολλαπλασιασμός των κυττάρων της υπο-οδοντινοβλαστικής στιβάδας και του υποκείμενου πολφού, ειδικά γύρω από αιμοφόρα αγγεία καθώς και αυξημένη παραγωγή κολλαγόνου τύπου I από τα κύτταρα της οδοντινοβλαστικής και της υπο-οδοντινοβλαστικής στιβάδας (Melin et al, 2000). Σε άλλη μελέτη, εφαρμογή μεμβράνης κολλαγόνου εμποτισμένης με TGFβ1, άμεσα στον πολφό δοντιών σκύλων, δεν οδήγησε στο σχηματισμό επανορθωτικής οδοντίνης ή τη διαφοροποίηση των κυττάρων του πολφού (Nakashima, 1994).

Οι μελέτες ωστόσο στις οποίες εξετάστηκε η επίδραση του TGFβ στην επουλωτική ικανότητα του δοντιού, αναφέρονται στον TGFβ1 και όχι σε άλλες ισομορφές του. Οι μελέτες αυτές, έχουν χρησιμοποιήσει διαφορετικές πειραματικές συνθήκες, ποικίλη δοσολογία και διαφορετικά μέσα εφαρμογής του TGFβ1 στον πολφό. Έχουν, επίσης, πραγματοποιηθεί σε διαφορετικά ζωικά μοντέλα αλλά και *in vitro*. Οι παραπάνω περιορισμοί οδηγούν στην ανάγκη διεξαγωγής νέων ερευνών, οι οποίες θα μπορούσαν να διευκρινίσουν τον μοριακό μηχανισμό δράσης των άλλων ισομορφών του TGFβ, σε συνδυασμό και με άλλους παράγοντες, στην επουλωτική ικανότητα του πολφού.



Τέλος, σε ότι αφορά την κάλυψη του πλφου με συγκολλητικούς παράγοντες, προκύπτει ότι στο θέμα αυτό υπάρχουν γενικά δύο αντικρουόμενες απόψεις, με συγκεκριμένες ομάδες ερευνητών να υποστηρίζουν τη μία ή την άλλη άποψη. Έτσι από τη μία πλευρά οι πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι ο καθοριστικός παράγοντας στη θεραπεία του ζωντανού πλφου είναι ο αποτελεσματικός έλεγχος της μικροδιδυσης, αφενός επειδή η φλεγμονή του πλφου στις μελέτες αυτές σχετιζόταν με την παρουσία των μικροβίων κάτω από τις αποκαταστάσεις και αφετέρου επειδή η επιτυχής επούλωση του πλφου σχετιζόταν με την ικανότητα του υλικού κάλυψης να παρεμποδίσει τη μικροδιδυση ή να θανατώσει τα βακτήρια. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν την άποψη ότι, απουσία μικροδιδυσης, η επούλωση του πλφου και ο σχηματισμός της γέφυρας οδοντίνης είναι γεγονότα ανεξάρτητα από το υλικό κάλυψης αυτό καθαυτό. Από την άλλη πλευρά ωστόσο υπάρχει μία πληθώρα κλινικών ερευνών σε ζωντανούς πλφούς ανθρώπων, που δείχνουν χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση του πλφου στην άμεση κάλυψη με συγκολλητικούς παράγοντες και μη σχηματισμό γέφυρας οδοντίνης ακόμα και απουσία μικροβιακού παράγοντα. Ανοιχτά παραμένουν επίσης τα ερωτήματα που αφορούν τους μοριακούς επουλωτικούς μηχανισμούς που ενεργοποιούνται στον ανθρώπινο πλφό μετά την εφαρμογή των συγκολλητικών παραγόντων. Απαιτούνται επομένως νέες μελέτες που θα μπορέσουν να απαντήσουν στο ερώτημα αν η χρήση των συγκολλητικών παραγόντων στη θεραπεία του ζωντανού πλφου μπορεί να θεωρηθεί ασφαλής και προβλέψιμη.

## **B. Ειδικό μέρος**

## Σκοπός

Η επουλωτική ικανότητα του συμπλέγματος πολφού-οδοντίνης μετά από βλάβη και την άμεση εφαρμογή, σε επαφή, συγκολλητικών συστημάτων ή Dycal σχετίζεται, τόσο με τον παράγοντα που εφαρμόζεται, όσο και με μια σειρά ενδογενών κυτταρικών μηχανισμών του ίδιου του συμπλέγματος. Ο σκοπός της μελέτης ήταν, χρησιμοποιώντας τομές ανθρώπινων δοντιών, να εξεταστούν *ex vivo*, οι πρώιμες κυτταρικές αποκρίσεις του πολφού μετά από εφαρμογή άμεσα σε αυτόν τριών διαφορετικών συγκολλητικών συστημάτων συνθέτων ρητινών και του Dycal, υλικό που θεωρείται χρυσή σταθερά στις μελέτες άμεσης κάλυψης πολφού. Η υπόθεση εργασίας ήταν ότι δεν υφίστανται στατιστικά σημαντικές διαφορές στις πρώιμες κυτταρικές αποκρίσεις του πολφού τόσο ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και τις πειραματικές ομάδες, όσο και μεταξύ των πειραματικών ομάδων.

## Υλικά και Μεθοδολογία

### *Συλλογή δειγμάτων*

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε τομές πλήρως εγκλείστων τρίτων γομφίων (n=30), που εξήχθησαν στην Κλινική Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής της Οδοντιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, μετά την έγγραφη συγκατάθεση των ασθενών (ηλικίας από 18 έως 30 ετών).

Αμέσως μετά την εξαγωγή, τα δόντια τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα κωνικά σωληνάρια των 50mL (falcon) που περιείχαν διάλυμα 'μεταφοράς' [DPBS (0.9mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5mM MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O, 2.7mM KCl, 1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137,93mM NaCl, 8.06mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), Penstrep 3%, και Fungizone 0.3% (Gibco™, Life Technologies Ltd, UK)]. Σε κάθε δόντι πραγματοποιήθηκαν 3-4 οβελιαίες συνεχείς τομές με παρειογλωσσική κατεύθυνση, πάχους 750μm, με διαμαντένιο δίσκο σε μικροτόμο σκληρών οδοντικών ιστών (IsoMet™ Low Speed Saw, Buehler, Illinois, USA), κάτω από συνεχή

καταιονισμό με το διάλυμα 'μεταφοράς' για την αποφυγή υπερθέρμανσης του ιστού. Αμέσως μετά την κοπή, οι τομές μεταφέρονταν στο χώρο της κυτταροκαλλιέργειας, μέσα σε αποστειρωμένα falcon, με ίδιας σύνθεσης με το προαναφερθέν, φρέσκο διάλυμα 'μεταφοράς'.

#### *Καλλιέργεια ιστών*

Εντός της απαγωγού εστίας των κυτταροκαλλιεργειών, σε συνθήκες αποστείρωσης, οι τομές ξεπλένονταν διεξοδικά με το φρέσκο διάλυμα 'μεταφοράς' και ακολουθούσε ήπιο στέγνωμα της οδοντίνης με αποστειρωμένο απορροφητικό χαρτί. Οι τομές διαμοιράζονταν τυχαία σε πέντε ομάδες (4 πειραματικές και 1 ελέγχου) όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.

## Πίνακας 1. Ομάδες μελέτης, σύνθεση και ιδιότητες των παραγόντων κάλυψης

ομάδα	εφαρμογή	κατασκευαστής	μηχανισμός δράσης	Σύνθεση
Control (ομάδα ελέγχου)	DPBS	ThermoFisher Scientific, Life Technologies Ltd, Paisley, UK		2.7mM KCl, 1.5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 137.9mM NaCl, 8mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
Prime&Bond	<u>1. Super etch 37%</u>  pH <1.0  <u>2. Prime&amp;Bond NT</u>  pH 2.1	1. Dentsply Int. Inc., Milford, Delaware, USA  2. SDI Limited, Victoria, Australia	Ολικής αδροποίησης αυτό-ενεργοποιητικό συγκολλητικό σύστημα  1. εφαρμογή φωσφορικού οξέος (ξέπλυμα, στέγνωμα) 2. εφαρμογή συγκολλητικού παράγοντα (πολυμερισμός)	Δι- και τριμεθακρυλικές ρητίνες, HEMA, PENTA, άμορφο διοξείδιο του πυριτίου, φωτοενεργοποιητές, σταθεροποιητές, υδροφθορική κετυλαμίνη, ακετόνη
Clearfil SE	Clearfil SE Bond  <u>1. primer</u>  pH 1.9  <u>2. bond</u>  pH 2.7	Kuraray Medica INC, Tokyo, Japan	Δύο σταδίων αυτό-αδروποιητικό/ενεργοποιητικό συγκολλητικό σύστημα  1. εφαρμογή αυτοαδροποιητικού primer (στέγνωμα) 2. εφαρμογή συγκολλητικής ρητίνης (πολυμερισμός)	BisGMA, HEMA, 10-MDP, υδρόφοβο αλειφατικό μεθακρυλικό, κολλοειδές πυρίτιο, φωτοενεργοποιητές καμφοροκινόνης, επιταχυντές, νερό
Clearfil S3	Clearfil S3 Bond  pH 2.7	Kuraray Medica INC, Tokyo, Japan	Ενός σταδίου αυτοαδροποιητικό συγκολλητικό σύστημα:  1. εφαρμογή αυτοαδροποιητικής συγκολλητικής ρητίνης (πολυμερισμός)	BisGMA, HEMA, 10-MDP, αιθανόλη, φθοριούχο νάτριο, υδρόφιλο αλειφατικό διμεθακρυλικό, υδρόφοβο αλειφατικό μεθακρυλικό, κολλοειδές πυρίτιο, φωτοενεργοποιητές καμφοροκινόνης, επιταχυντές, νερό
Dycal	Dycal  pH 9.0-11.0	Dentsply Int. Inc., Milford, Delaware, USA	Χημικά πολυμεριζόμενο ακτινοσκιερό υδροξείδιο του ασβεστίου	<u>Πάστα βάσης:</u> 1,3 βουτυλενο-1-γλυκολ-διακυλικό οξύ, οξείδιο ψευδαργύρου, φωσφορικό ασβέστιο βολβραμιούχο ασβέστιο, οξείδιο σιδήρου, χρωστικές οξειδίου του σιδήρου  <u>Πάστα καταλύτη:</u> υδροξείδιο του ασβεστίου, N-αιθυλ-ο/ρ-τολουολοσουλφοναμίδιο, οξείδιο ψευδαργύρου, διοξείδιο τιτανίου, στεατικός ψευδάργυρος, χρωστικές οξειδίου του σιδήρου

Τα 3 συγκολλητικά συστήματα (Prime&BondNT, Clearfil SE Bond, και Clearfil S3 Bond) εφαρμόζονταν με εντριπτήρα συγκολλητικού συστήματος extra fine (TPC Advanced Technology, Inc, City of Industry, CA) απευθείας στον πολφό στο σημείο αντίστοιχα με το πολφικό κέρασ και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο πολυμερισμός γινόταν με λυχνία LED (Radii Plus, SDI Limited, Victoria, Australia) (φάσμα εκπομπής: 440-480nm, 1500mW/cm<sup>2</sup>, σε συνεχή ένταση). Συγκεκριμένα, στην ομάδα Prime&Bond, αρχικά στον πολφό εφαρμοζόταν το φωσφορικό οξύ για 15sec. Ακολουθούσε το ξέπλυμά του και στέγνωμα της τομής με αποστειρωμένο απορροφητικό χαρτί. Εν συνεχεία στο ίδιο σημείο του πολφού εφαρμοζόταν με εντριπτήρα μικρή ποσότητα συγκολλητικού συστήματος Prime&BondNT, το οποίο φωτοπολυμεριζόταν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ζώνη αναστολής πολυμερισμού του συγκολλητικού συστήματος απομακρυνόταν με ένα νέο εντριπτήρα που είχε διαβραχεί προηγουμένος με καθαρή αιθανόλη. Στην ομάδα Clearfil SE Bond αρχικά εφαρμοζόταν με εντριπτηρα ο ενεργοποιητής (primer), ενώ ακολουθούσε το στέγνωμά του με αποστειρωμένο απορροφητικό χαρτί. Στη συνέχεια εφαρμοζόταν με νέο εντριπτήρα η συγκολλητική ρητίνη (bond) και ακολουθούσε φωτοπολυμερισμός. Η διαχείριση της ζώνης αναστολής πολυμερισμού γινόταν με τον ίδιο τρόπο που προαναφέρθηκε. Στην ομάδα Clearfil S3 Bond, το συγκολλητικό συστήματα εφαρμοζόταν στον πολφό σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ενώ η διαχείριση της ζώνης αναστολής πολυμερισμού γινόταν με τον τρόπο που προαναφέρθηκε. Το Dycal εφαρμοζόταν με το εργαλείο τοποθέτησης υδροξειδίου ασβεστίου (εργαλείο Dycal). Στην ομάδα έλεγχου, σε αντίστοιχη θέση με αυτή τοποθέτησης των συγκολλητικών παραγόντων ή του Dycal, εφαρμόζονταν με εντριπτήρα το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας [DMEM με 3% Penstrep, και 0.3% Fungizone (Gibco™, Life Technologies Ltd, UK)]. Αμέσως μετά, οι τομές τοποθετούνταν σε τρυβλία (Costar® 6 Well Clear TC-Treated Multiple Well Plates, Corning Incorporated, NY, USA) καλυπτόμενα με 3mL θρεπτικού μέσου καλλιέργειας και διατηρούνταν στον επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C, με περιεκτικότητα της ατμόσφαιρας 95% σε αέρα και 5% σε CO<sub>2</sub>, για 4 ημέρες. Τα δείγματα ελέγχονταν καθημερινά σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο για εντοπισμό τυχόν μόλυνσης, χωρίς να γίνονται αλλαγές στο θρεπτικό μέσο. Σε περίπτωση υποψίας μόλυνσεων, οι

τομές απομακρύνονταν άμεσα και απορρίπτονταν σύμφωνα με το πρωτόκολλο διαχείρισης των καλλιεργούμενων ιστών.

### *Χρώση MTT*

Για την άμεση οπτική εκτίμηση της ζωτικότητας του ιστού και της μεταβολικής ικανότητας των κυττάρων μετά την εφαρμογή των τριών συγκολλητικών συστημάτων και του Dycal, πραγματοποιήθηκε σε τυχαία επιλεγμένες τομές από όλες τις ομάδες, η χρωματομετρική μέθοδος που βασίζεται στο MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Biovision Inc, California, US)] σε τρία διαφορετικά χρονικά σημεία: αμέσως μετά τους χειρισμούς (t=0), 24 ώρες (t=24) και 48 (t=48) ώρες μετά την εφαρμογή του παράγοντα. Η ζωτικότητα του ιστού εκτιμήθηκε με βάση την αναγωγή του MTT από άλας τετραζόλης (κίτρινο) σε αδιάλυτη μορφή φορμαζάνης (ιώδες) και την παρατήρηση της έντασης του ιώδους χρώματος, που αναδεικνύει τα ζώντα κύτταρα με ενεργή μιτοχονδριακή δραστηριότητα.

### *Επεξεργασία ιστών*

Μετά το πέρας της καλλιέργειας, όλες οι τομές των δοντιών μονιμοποιούνταν σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεύδης (PFA) (50ml ανά τομή) για 48 ώρες, σε θερμοκρασία 4°C. Ακολουθούσε ξέπλυμα σε τρεχούμενο νερό για 2 ώρες.

Οι τομές των 750μm που θα χρησιμοποιούνταν για την ανοσοϊστοχημική εντόπιση της Βιμεντίνης και του TGFβ2 ακολουθούσαν μια διαδικασία κρυοπροστασίας σε διάλυμα σακχαροζης 20% για 24 ώρες, στους 4°C. Εν συνεχεία ο πολφός αφαιρείτο με τη βοήθεια της περιοδοντικής μύλης και ακολουθούσε ο εγκιβωτισμός του σε μέσο ψύξης Tissue-tec (Jung Tissue Freezing Medium™, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) με εμπύθιση σε ισοπεντάνιο -20°C. Οι κύβοι που προκύπτανε κόβονταν σε συνεχόμενες τομές πάχους 15μm σε κρουστόμο (Leica

CM1950; Leica, Wetzlar, Germany), που στη συνέχεια φυλάσσονταν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Οι τομές που θα χρησιμοποιούνταν για τη χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη, τη μέθοδο *TUNEL* και την ανοσοϊστοχημική εντόπιση του ERdj5 απασβεστιώθηκαν υπό ανάδευση σε διάλυμα EDTA 10% (pH 7.0) για 16 εβδομάδες. Το διάλυμα EDTA ανανεωνόταν κάθε δύο μέρες. Μετά το πέρας της απομεταλλικοποίησης, ακολουθούσε ξέπλυμα σε τρεχούμενο νερό για 2 ώρες, η αδαμαντίνη αφαιρείτο από τις τομές και οι τελευταίες αφυδατώνονταν σε διαλύματα αλκοόλης, με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Στη συνέχεια εγκιβωτίζονταν σε παραφίνη και κόβονταν σε λεπτές τομές πάχους 5 $\mu\text{m}$ , με μικροτόμο παραφίνης ((Leica RM2125RT; Leica, Wetzlar, Germany).

#### *Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης*

Για την ιστολογική παρατήρηση, χρησιμοποιήθηκαν τρεις τομές παραφίνης πάχους 5 $\mu\text{m}$ , προερχόμενες από την αρχική τομή δοντιού των 750 $\mu\text{m}$  κάθε ομάδας. Στις λεπτές αυτές τομές πραγματοποιήθηκε διαδοχική χρώση με αιματοξυλίνη και ηωσίνη. Η παρατήρηση έγινε σε οπτικό μικροσκόπιο (Leica DM LS2 Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

#### *Μέθοδος TUNEL*

Για την εκτίμηση του βαθμού απόπτωσης των κυττάρων του πολφού, εφαρμόστηκε σε τομές παραφίνης η μέθοδος *TUNEL*, με χρήση του κιτ AporTag® Plus (Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit, S7101, Millipore, Temecula, California, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: αποπαραφίνωση των τομών σε ξυλόλη και επανυδάτωση σε διαδοχικά διαλύματα με μειούμενη συγκέντρωση αιθανόλης (100%, 90%, 80%, 70%), πλύση σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) και επεξεργασία με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% σε PBS για 5min. Αμέσως μετά εφαρμόζονταν το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης (Equilibration



Buffer) για 10sec και ακολουθούσε επώαση με το ένζυμο Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) στους 37°C για 1 ώρα. Η δραστηριότητα του ενζύμου σταματούσε με πλύση σε ρυθμιστικό διάλυμα τερματισμού (Stop/Wash Buffer) για 10min, και πλύση σε PBS. Ακολουθούσαν η επώαση με Anti-Digoxigenin Conjugate για 30min, η επώαση με το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης (το DAB), η χρώση με αιματοξυλίνη (συμπληρωματικά, counterstaining) και η τοποθέτηση καλυπτρίδας με γέλη γλυκερόλης (Glycergel Dako).

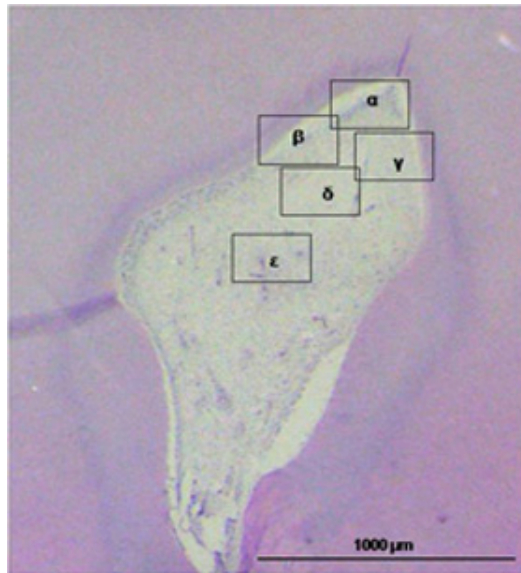
### *Ανοσοϊστοχημεία*

Για την ανοσοϊστοχημική εντόπιση της Βιμεντίνης και του TGFβ2, οι τομές κρουστού μεταφέρονταν σε θερμοκρασία δωματίου για 15min. Ακολουθούσε η πλύση των τομών σε διάλυμα PBS και 0.4% Triton καθώς και η επώαση σε διάλυμα αποκλεισμού [10% Normal Goat Serum, (NGS, Dako Glostrup, Denmark) διαλυμένο σε PBS+0.4% Triton, για 1 ώρα. Στη συνέχεια, οι τομές επώαζονταν είτε με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της Βιμεντίνης [anti-Vimentin antibody 1/200 (Dako)] είτε με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι του TGFβ2 [anti-TGFβ2 antibody 1/100 (Spring Bioscience Co, Pleasanton, CA)], για μία νύχτα, στους 4°C, σε διάλυμα PBS με 10% NGS και 0.2% Triton. Την επόμενη ημέρα πραγματοποιούνταν η επώαση με τα δευτερογενή αντισώματα για 2 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου. Συγκεκριμένα, δευτερογενές αντίσωμα goat anti-mouse IgG-biotinylated 1/800 (Dako) χρησιμοποιήθηκε για τη Βιμεντίνη και goat anti-rabbit IgG-biotinylated 1/800 (Dako) για το TGFβ2. Ακολούθως, οι τομές επώαζονταν με το σύμπλεγμα Αβιδίνης-Βιοτίνης-Υπεροξειδάσης (ABC Kit, Vector Laboratories Ltd, Peterborough, UK) για 1 ώρα. Η διαδικασία ολοκληρώνονταν με πλύσεις, επώαση με το υπόστρωμα DAB της υπεροξειδάσης, διαδοχικές αφυδατώσεις σε διαλύματα αιθανόλης και κάλυψη των τομών. Η οπτική παρατήρηση γινόταν σε οπτικό μικροσκόπιο (Leica DM LS2 Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)

Για την ανοσοϊστοχημική εντόπιση του ERdj5, οι τομές παραφίνης αποπαραφινώνονταν σε ξυλόλη και ενυδατώνονταν σε διαδοχικά διαλύματα αιθανόλης (100%, 90%, 80%, 70%). Για την αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων, οι

τομές επώζονταν σε διάλυμα 10% EDTA (pH 9.0). Η δραστικότητα της ενδογενούς υπεροξειδάσης εξουδετερώνονταν με επώαση σε διάλυμα PBS που περιείχε 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και 10% μεθανόλη, για 20min. Ακολουθούσε επώαση με διάλυμα αποκλεισμού [10% Normal Goat Serum, NGS διαλυμένο σε PBS και 0.4% Triton] για 1 ώρα. Ως πρωτογενές αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε το anti-ERdj5 (rabbit Polyclonal 1/100, Proteintech Group, Inc., Chicago, IL, USA). Ως δευτερογενές αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε το goat anti-rabbit IgG-biotinylated 1/500 (Dako).

Για την ποσοτικοποίηση του σήματος, μετά την ανοσοϊστοχημεία και το TUNEL, πραγματοποιούνταν η μέτρηση των θετικών κυττάρων με το λογισμικό Image J (version 1.45, NIH, Bethesda, MD, USA), σε φωτογραφίες μικροσκοπίου, με μεγέθυνση αντικειμενικών φακών 40x. Σε κάθε δείγμα εξετάζονταν πέντε συγκεκριμένες περιοχές του πνεύμονα όπως φαίνεται στην Εικ.1. Η μέτρηση πραγματοποιούνταν τυφλά, από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές, με τη μεταξύ τους συμφωνία να ανέρχεται σε ποσοστό >90%.



**Εικ.1.** Περιοχές του πλφού που εξετάστηκαν με ανοσοϊστοχημική ανάλυση. **α:** περιοχή εφαρμογής παράγοντα κάλυψης. **β, γ, δ:** περιοχές προσκείμενες προς την περιοχή εφαρμογής παράγοντα κάλυψης. **ε:** κεντρική περιοχή του πλφού.

### *Ανοσοσύπωση κατά Western*

Για την εκτίμηση της επίδρασης των παραγόντων κάλυψης στα επίπεδα της Βιμεντίνης, του TGFβ2 και του ERdj5 σε ολόκληρη την τομή του πολφού, πραγματοποιήθηκε η ανοσοσύπωση κατά Western. Μετά από τις τέσσερις μέρες καλλιέργειας, αφαιρούνταν ο πολφός, από κάθε τομή των 750μm, με τη βοήθεια περιodontικής μύλης και αποθηκεύονταν στους -80°C. Ακολουθούσε η ομογενοποίηση των δειγμάτων σε διάλυμα λύσης [20mM Tris-HCl (pH=7.5), 137mM NaCl, 10% glycerol, 48mM NaF, 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1%NP-40], η φυγοκέντρηση του ομογενοποιημένου στις 15.000 στροφές/min για 20min, σε θερμοκρασία 4°C και η συλλογή του υπερκείμενου κυτταρικού εκχυλίσματος, το οποίο αποθηκεύονταν σε νέα φιαλίδια τύπου erpendorf στους -80°C. Η συνολική συγκέντρωση της πρωτεΐνης προσδιοριζόταν φωτομετρικά με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα μήκη κύματος 260 και 280 nm. Οι πρωτεΐνες (30 μg ανά δείγμα) ηλεκτροφορούσαν σε τυποποιημένο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Invitrogen, Life Technologies Ltd, Paisley, UK), μεταφερόταν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και υπό ανάδυση επωζόταν με τα εξής πρωτογενή αντισώματα: Anti-Vimentin (mouse monoclonal 1/200 (Dako); Anti-TGFβ2 (rabbit polyclonal 1/10 Spring Bioscience); Anti-ERdj5 (rabbit polyclonal 1/500 Proteintech Group) και Anti-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH mouse monoclonal (1/500 Millipore, Billerica, MA, USA, 1/10 000). Η GAPDH (housekeeping πρωτεΐνη), η έκφραση της οποίας δε μεταβάλλεται στο παρόν σύστημα, χρησιμοποιήθηκε για την ομαλοποίηση των συγκεντρώσεων της ολικής πρωτεΐνης κάθε δείγματος που φορτώθηκε. Η επώαση πραγματοποιούνταν στους 4°C, σε TBS (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, pH 7.6) ενισχυμένο με 0.05% Tween-20 και 5% γάλα σε σκόνη χωρίς λιπαρά. Η επώαση με δευτερογενή αντισώματα: goat anti-mouse IgG-biotinylated 1/100.000 (Dako); goat anti-rabbit IgG-HRP 1/75.000 (Millipore, Billerica, MA, USA); goat anti-mouse IgG-biotinylated 1/50.000 (Dako) γινόταν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Η οπτικοποίηση του σήματος της πρωτεΐνης πραγματοποιούνταν με τη χρήση υπεροξειδάσης DAB ή χημειοφωταύγειας (ECL, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Κάθε πειραματική διαδικασία επαναλαμβανόταν τρεις φορές. Η ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων μεταξύ των μεμβρανών γινόταν με την παρουσία ενός κοινού δείγματος σε κάθε

ηλεκτροφόρηση. Η ποσοτικοποίηση της οπτικής πυκνότητας στις ζώνες των πρωτεϊνών στο φιλμ γινόταν με το λογισμικό Image J (version 1.45, NIH, Bethesda, MD, USA).

### *Στατιστική ανάλυση*

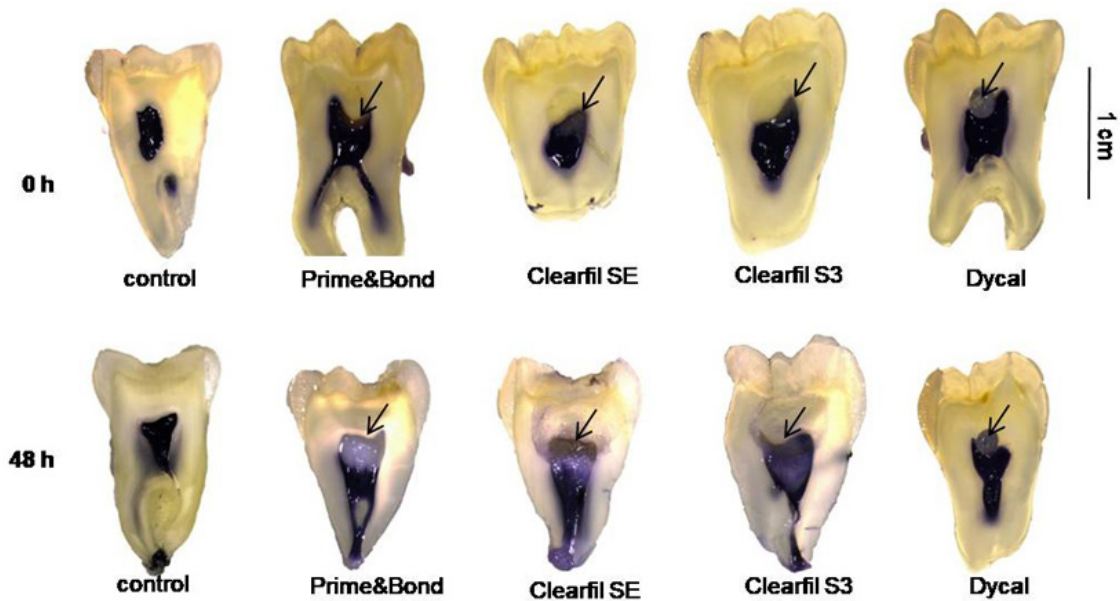
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα SPSS 22.0 (IBM, Armonk, NY, USA) για τις ακόλουθες παραμέτρους: TUNEL, ανάλυση κατά Western για Βιμεντίνη, ERdj5, TGFβ2, και ανοσοϊστοχημική ανάλυση για ERdj5 και TGFβ2. Η δοκιμασία διακύμανσης ANOVA κατά ένα κριτήριο (one-way) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της στατιστικά σημαντικής επίδρασης του παράγοντα κάλυψης. Όταν διαπιστωνόταν στατιστική διαφορά στην επίδραση του παράγοντα, ακολουθούσε σύγκριση μεταξύ ομάδων, με την LSD post-hoc δοκιμασία. Οι τιμές  $p < 0.05$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

### **Αποτελέσματα**

#### *Επίδραση στη ζωτικότητα των κυττάρων, την ακεραιότητα του ιστού και την απόπτωση*

Η εκτίμηση της μεταβολικής δραστηριότητας και της ζωτικότητας των κυττάρων του πνεύμονα μετά την εφαρμογή των συγκολλητικών συστημάτων και του Dycal έγινε με τη χρώση MTT. Όπως φαίνεται στην Εικ.2, όλοι οι παράγοντες που εφαρμόστηκαν επηρέασαν τη ζωτικότητα των κυττάρων του πνεύμονα στην περιοχή της εφαρμογής. Συγκεκριμένα, στην ομάδα ελέγχου, το έντονο ομοιόμορφο ιώδες χρώμα, το οποίο οφείλεται στην πλήρη μετατροπή της τετραζόλης σε φορμαζάνη, υποδεικνύει ικανοποιητική κυτταρική ζωτικότητα. Στις τρεις ομάδες στις οποίες εφαρμόστηκαν οι συγκολλητικοί παράγοντες (Prime&Bond, Clearfil SE, Clearfil S3), το μειωμένου

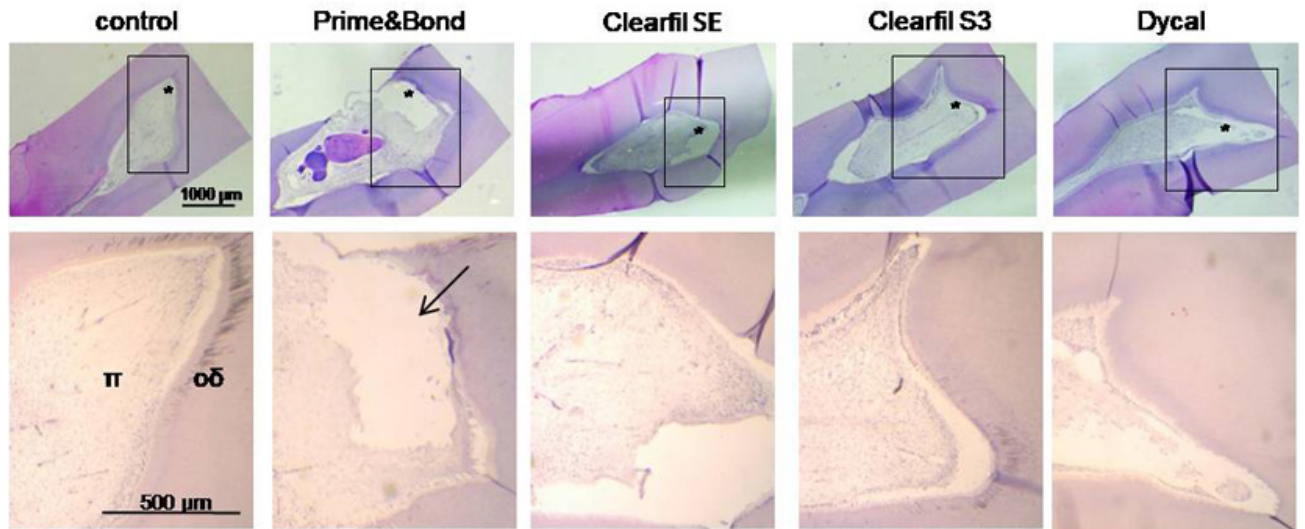
έντασης ιώδες χρώμα στο μυλικό τμήμα του πολφού, αμέσως μετά την εφαρμογή (χρονικό σημείο  $t=0h$ ), είναι χαρακτηριστικό της απώλειας ζωτικότητας του ιστού στην περιοχή της εφαρμογής. Παρόμοια, αλλά περιορισμένης έκτασης, νεκρωτική ζώνη παρατηρήθηκε και στην ομάδα που εφαρμόστηκε το Dycal, αμέσως μετά την εφαρμογή ( $t=0h$ ). Μετά από 48 ώρες ( $t=48h$ ), στις τρεις ομάδες που εφαρμόστηκαν οι συγκολλητικοί παράγοντες, η μειωμένη χρώση γίνεται περισσότερο εμφανής, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ η νεκρωτική ζώνη εκτείνεται σε μεγαλύτερη έκταση του πολφού γύρω από τη σημειακή περιοχή της εφαρμογής. Στην ομάδα που εφαρμόστηκε το Dycal, η σχετικά περιορισμένης έκτασης νεκρωτική ζώνη που παρατηρήθηκε αμέσως μετά την εφαρμογή ( $t=0h$ ), δεν άλλαξε σε διαστάσεις μετά από 48 ώρες ( $t=48h$ ).



**Εικ.2.** Χρώση MTT σε τομές δοντιών 750 $\mu$ m τοποθετημένες σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, αμέσως (0h, επάνω σειρά) και 48ώρες (κάτω σειρά) μετά την εφαρμογή θρεπτικού μέσου στην ομάδα ελέγχου (control group), των συγκολλητικών παραγόντων Prime&Bond, Clearfil SE, Clearfil S3, και του Dycal στις αντίστοιχες ομάδες. Τα βέλη δηλώνουν την περιοχή εφαρμογής.

Η μικροσκοπική παρατήρηση των χρωσμένων με αιματοξυλίνη-ηωσίνη λεπτών τομών μετά το πέρας της καλλιέργειας, επαλήθευσε τα αποτελέσματα της χρώσης ΜΤΤ που παρατηρήθηκαν στις τομές δοντιών των 750μm (Εικ.3). Συγκεκριμένα, στην ομάδα που εφαρμόστηκε το συγκολλητικό σύστημα Prime&Bond, η βλάβη του ιστού ήταν εμφανής σε όλες τις τομές στην περιοχή εφαρμογής του φωσφορικού οξέος, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Στις ομάδες που εφαρμόστηκαν τα συγκολλητικά συστήματα Clearfil SE και Clearfil S3, παρατηρήθηκε επίσης διαφορετικής έκτασης βλάβη του ιστού με χαρακτηριστικά νεκρωτικής ζώνης και πέραν του σημείου εφαρμογής. Στην ομάδα που εφαρμόστηκε το Dycal, η νεκρωτική ζώνη ήταν περιορισμένη στο σημείο εφαρμογής. Συνοψίζοντας, η εφαρμογή στον πολφό των συγκολλητικών συστημάτων που εξετάστηκαν είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια της ζωτικότητας των κυττάρων του πολφού καθώς και αρκετά εκτεταμένη ιστική βλάβη, η οποία ήταν περισσότερο εμφανής στην ομάδα που εφαρμόστηκε το σύστημα Prime&Bond. Η εφαρμογή του Dycal προκάλεσε, επίσης, βλάβη του ιστού, η οποία όμως περιοριζόταν στο σημείο τοποθέτησής του.

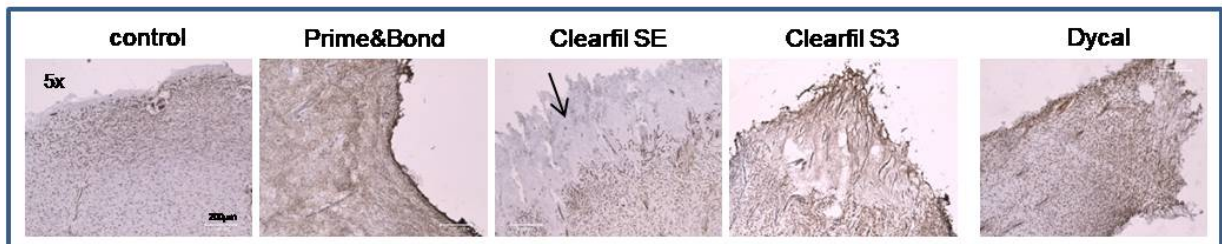
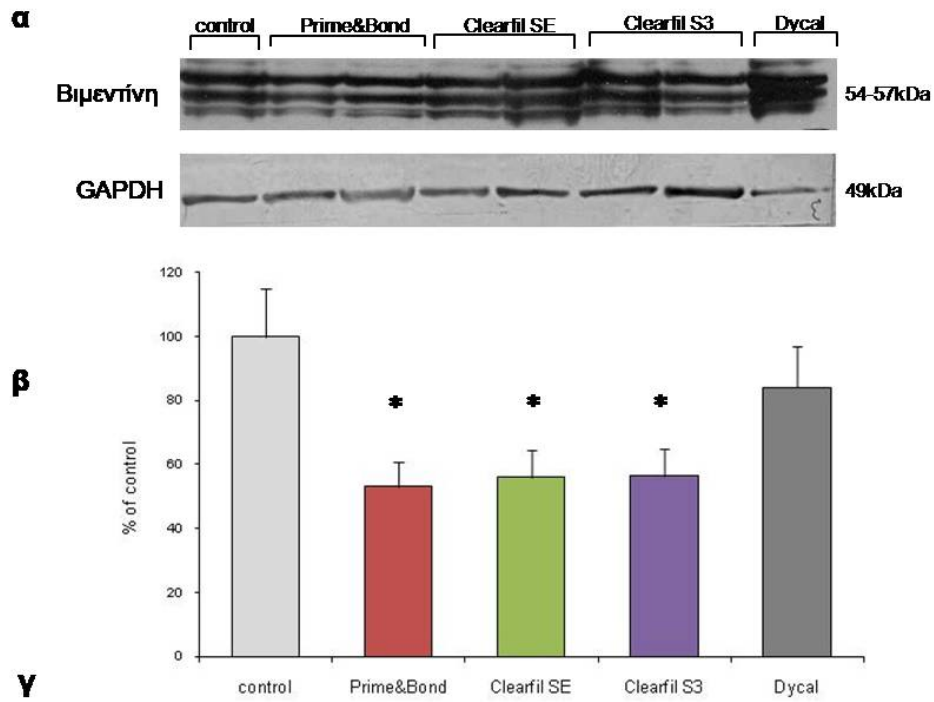




**Εικ.3.** Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης σε τομές παραφίνης. Εικόνες από το στερεομικροσκόπιο (επάνω σειρά) και το οπτικό μικροσκόπιο (κάτω σειρά, περιοχή περιγεγραμμένη στην αντίστοιχη εικόνα του στερεομικροσκοπίου) για την ομάδα ελέγχου (control) και τις ομάδες Prime&Bond, Clearfil SE, Clearfil S3 και Dycal. Ο αστερίσκος δηλώνει την περιοχή εφαρμογής παράγοντα κάλυψης. Βέλη δηλώνουν την καταστροφή του πολφικού ιστού στην περιοχή εφαρμογής του Prime&Bond / φωσφορικού οξέος. π: πολφός, οδ: οδοντίνη.

Σε ότι αφορά τα επίπεδα Βιμεντίνης, σε ολόκληρο το παρασκεύασμα του πολφού, όπως εκτιμήθηκαν με την ανοσοσύτρωση κατά Western, η εφαρμογή των παραγόντων είχε στατιστικά σημαντική επίδραση ( $F_{(8767.4;4)}=5.149$ ,  $p=0.012$ ) (Εικ.4α). Η επακόλουθη post-hoc ανάλυση έδειξε ότι τα επίπεδα Βιμεντίνης ήταν μειωμένα στις ομάδες Prime&Bond, Clearfil SE και Clearfil S3 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ( $p=0.003$ , 95% CI:19.56, 74.14,  $p=0.007$ , 95% CI:14.74, 73.09 και  $p=0.003$ , 95% CI:17.47, 69.66, αντίστοιχα). Τα επίπεδα Βιμεντίνης στην ομάδα Dycal δεν διέφεραν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ( $p=0.313$ ) (Εικ.4β). Η ανοσοϊστοχημική εντόπιση της Βιμεντίνης σε διαφορετικές περιοχές του πολφού έδειξε, επίσης, μειωμένα επίπεδα στην περιοχή εφαρμογής όλων των παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου και του Dycal (Εικ.4γ). Επομένως, η εφαρμογή όλων των συγκολλητικών συστημάτων φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα Βιμεντίνης στην περιοχή εφαρμογής τους. Στην περίπτωση του Dycal, η μείωση αυτή φαίνεται να είναι πιο περιορισμένη.

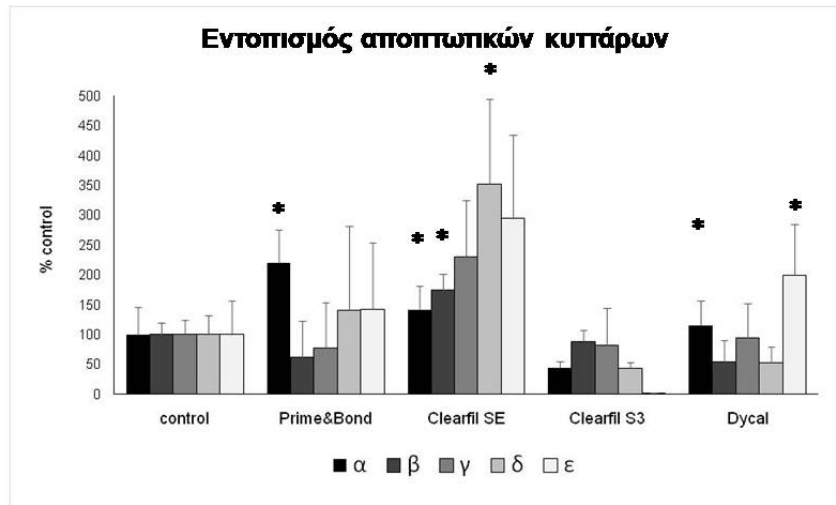
## Επίπεδα Βιμεντίνης



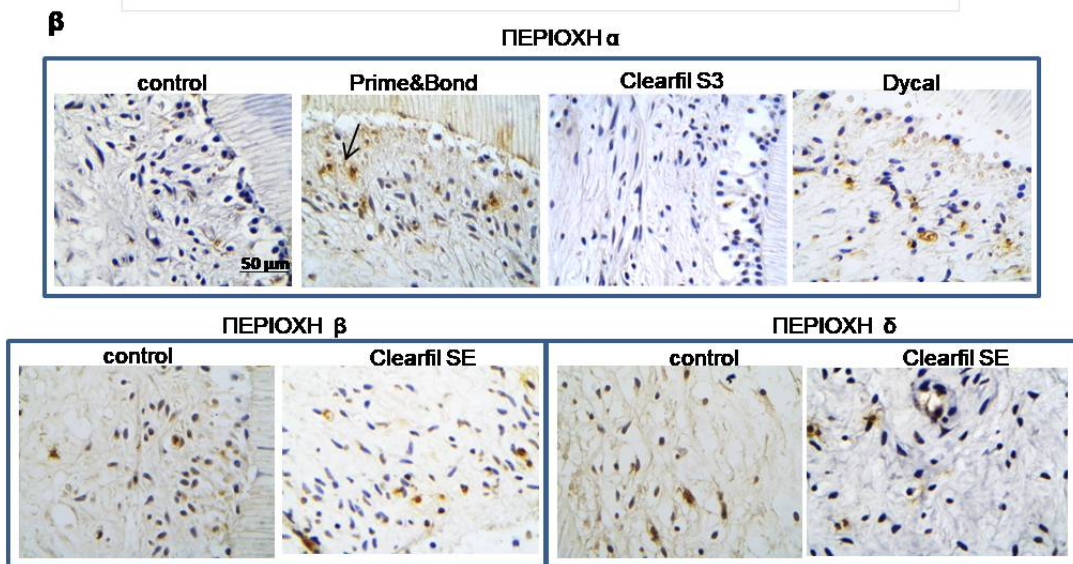
**Εικ.4.** Προσδιορισμός επιπέδων της Βιμεντίνης σε τομές του πλφου. **(α)** Αντιπροσωπευτική εικόνα Western blot. GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη ελέγχου. **(β)** Ποσοτικοποίηση των δεδομένων από το Western blot. Στο ιστόγραμμα τα αποτελέσματα φαίνονται ως λόγος της μέσης τιμής της οπτικής πυκνότητας της Βιμεντίνης προς την αντίστοιχη GAPDH  $\pm$  standard error of mean (SEM) και είναι εκφρασμένα ως % των επιπέδων της Βιμεντίνης στην ομάδα ελέγχου. Το \* δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. **(γ)** Ανοσοϊστοχημική εντόπιση της Βιμεντίνης σε διαφορετικές περιοχές του πλφου με εμφανώς μειωμένα τα επίπεδά της στην περιοχή εφαρμογής όλων των παραγόντων κάλυψης.

Η επίδραση των παραγόντων στην απόπτωση των κυττάρων εξετάστηκε με τη μέθοδο TUNEL. Ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων μετρήθηκε σε πέντε διαφορετικές περιοχές του πολφού, όπως προσδιορίζονται στην εικ.1. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η απόπτωση ήταν πιο έντονη στην περιοχή εφαρμογής των ομάδων Prime&Bond, Clearfil SE και Dycal σε σχέση με την αντίστοιχη περιοχή της ομάδας ελέγχου ( $p=0.007$ , 95% CI:-242.32, -46.63,  $p=0.001$ , 95% CI:104.61, 313.81 και  $p=0.037$ , 95% CI:7.42, 203.11 αντίστοιχα) (Εικ.5α). Η post-hoc ανάλυση έδειξε ότι ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων στην περιοχή εφαρμογής της ομάδας Clearfil S3 δεν διέφερε σε βαθμό στατιστικά σημαντικό από την ομάδα ελέγχου ( $p=0.176$ ) ενώ ήταν αυξημένος σε αντίστοιχες περιοχές στις ομάδες Prime&Bond ( $p=0.001$ , 95% CI:-313.81, -104.62), Clearfil SE ( $p=0.013$ , 95% CI:-228.11, -32.43) και Dycal ( $p=0.039$ , 95% CI:-201.79, -6.11). Σε περιοχή παρακείμενη της εφαρμογής παραγόντων (περιοχή #β στην Εικ.1), ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων στην ομάδα Clearfil SE ήταν αυξημένος σε σχέση με τις περιοχές #β σε όλες τις άλλες ομάδες ( $p=0.012$ , 95% CI:25.01, 170.46 vs. ομάδας ελέγχου,  $p=0.008$ , 95% CI:34.26, 191.38 vs. Prime&Bond,  $p=0.034$ , 95% CI:7.34, 164.46 vs. Clearfil SE, και  $p=0.003$ , 95% CI:47.78, 193.24 vs. Dycal). Στην κεντρική περιοχή του πολφού (περιοχή #δ στην Εικ.1) ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων στην ομάδα Clearfil SE ήταν, επίσης, αυξημένος σε σχέση με τις περιοχές #δ άλλων ομάδων ( $p=0.005$ , 95% CI:97.49, 456.97 vs. control,  $p=0.035$ , 95% CI:17.62, 405.90 vs. Prime&Bond,  $p=0.004$ , 95% CI:114.68, 502.96 vs. Clearfil SE,  $p=0.003$ , 95% CI:120.26, 479.76 vs. Dycal) (Εικ.5β). Συνοψίζοντας, σε ό,τι αφορά στον αριθμό των αποπτωτικών κυττάρων, η εφαρμογή του συγκολλητικού συστήματος Clearfil SE είχε ως αποτέλεσμα την πιο εκτεταμένη ιστική βλάβη. Ακολουθούσαν, ως προς τη σοβαρότητα της απόπτωσης, οι παράγοντες Prime&Bond και Dycal. Η εφαρμογή του Clearfil S3 δεν επηρέασε το βαθμό απόπτωσης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.

**α**



**β**



**Εικ.5.** Εντοπισμός των αποπτωτικών κυττάρων σε τομές πολφού με τη μέθοδο TUNEL. **(α)** Ποσοτικοποίηση της μεθόδου TUNEL σε διαφορετικές περιοχές του πολφού (περιοχές α, β, γ, δ, ε, απεικονίζονται με διαφορετικού χρώματος μπάρες). Ο μέσος αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων σε κάθε περιοχή  $\pm$  standard error of mean (SEM) είναι εκφρασμένος ως % του μέσου αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων στην αντίστοιχη περιοχή της ομάδας ελέγχου. Το \* δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. **(β)** Αντιπροσωπευτικές ανοσοϊστοχημικές εικόνες που δείχνουν παρουσία αποπτωτικών κυττάρων (καφέ χρώση DAB) στην περιοχή εφαρμογής παραγόντων κάλυψης (περιοχή α) και στις παρακείμενες περιοχές β και δ.

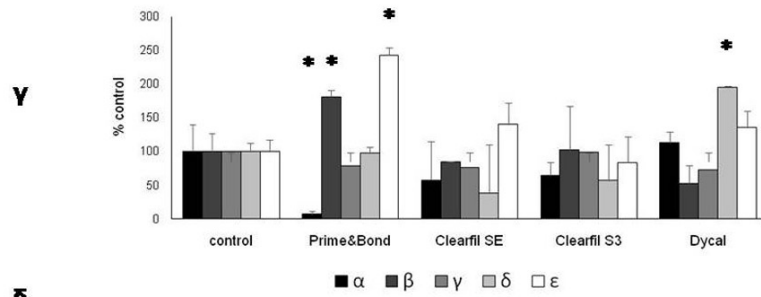
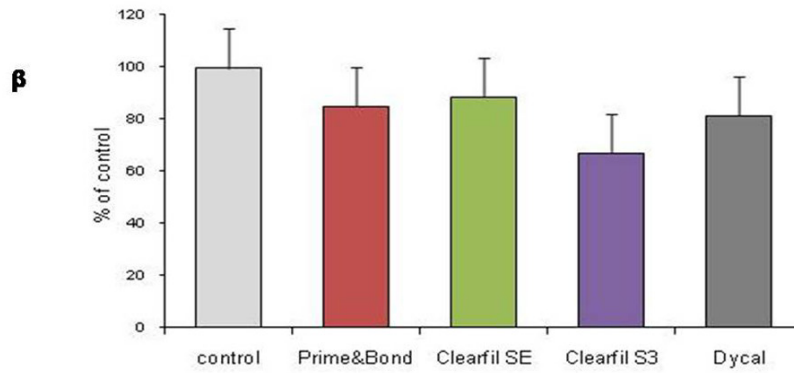
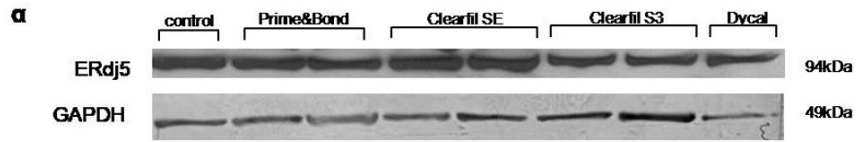
## *Επίδραση στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) και τον αυξητικό παράγοντα TGFβ2*

Τα επίπεδα του δείκτη στρες του ενδοπλασματικού δικτύου ERdj5 στον πολφό προσδιορίστηκαν τόσο με ανοσοσύτωση κατά Western, όσο και με ανοσοϊστοχημεία (εικ.6). Η ποσοτικοποίηση των δεδομένων της ανοσοσύτωσης κατά Western έδειξε απουσία στατιστικά σημαντικής επίδρασης των παραγόντων που εξετάστηκαν ( $F_{(4598.47;4)} = 2.268$ ,  $p=0.122$ ) στα συνολικά επίπεδα της πρωτεΐνης ERdj5 στον πολφό (Εικ.6α,β). Ωστόσο, τα δεδομένα της ανοσοϊστοχημείας, με μέτρηση θετικά βαμμένων κυττάρων στις πέντε ξεχωριστές περιοχές του πολφού (βλέπε Εικ.1), έδειξαν στατιστικά σημαντική επίδραση των παραγόντων ( $F_{(30183.68;4)}=5.118$ ,  $p=0.011$ ). Η post-hoc σύγκριση μεταξύ των ομάδων για κάθε περιοχή του πολφού ξεχωριστά, έδειξε ότι τα επίπεδα του ERdj5 τροποποιούνται τόσο ανάλογα με την περιοχή εφαρμογής του εκάστοτε παράγοντα, όσο και ανάλογα με τον τύπο του παράγοντα (Εικ.6γ,δ). Συγκεκριμένα, τα επίπεδα του ERdj5 μειώθηκαν στην περιοχή εφαρμογής του συγκολλητικού παράγοντα Prime&Bond τόσο σε σχέση με την αντίστοιχη περιοχή στην ομάδα ελέγχου ( $p=0.006$ , 95% CI:-125.23, -26.13) όσο και σε σχέση με την αντίστοιχη περιοχή όλων των άλλων πειραματικών ομάδων ( $p=0.06$ , 95% CI:-103.53, -2.41,  $p=0.021$ , 95% CI:-104.68, -9.93 και  $p=0.001$ , 95% CI:-159.15, -53.21) για Clearfil SE, Clearfil S3 και Dycal, αντίστοιχα. Αντιθέτως, στην ίδια ομάδα Prime&Bond τα επίπεδα του ERdj5 αυξήθηκαν στην παρακείμενη περιοχή εκείνης της εφαρμογής (#β) καθώς και στην κεντρική περιοχή (#ε) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ( $p=0.005$ , 95% CI:-35.06, -155.29,  $p<0.001$ , 95% CI:-114.41, -212.31 αντίστοιχα), την ομάδα Clearfil SE ( $p=0.006$ , 95% CI:-32.01, -160.54,  $p=0.001$ , 95% CI:50.92, 155.60 αντίστοιχα), την ομάδα Clearfil S3 ( $p=0.010$ , 95% CI:32.00, 136.96,  $p<0.001$ , 95% CI:113.03, 206.63 αντίστοιχα) και την ομάδα Dycal ( $p=0.001$ , 95% CI:64.47, 193.00,  $p=0.001$ , 95% CI:55.87, 160.52 αντίστοιχα) (Εικ.6γ,δ). Τα επίπεδα του ERdj5 αυξήθηκαν, επίσης, στην κεντρική περιοχή του πολφού (#δ) στην ομάδα Dycal σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ( $p<0.001$ , 95% CI:-64.49, -162.18), την ομάδα Prime&Bond ( $p=0.001$ , 95% CI:45.28, 149.72), Clearfil SE ( $p<0.001$ , 95% CI:105.28, 209.73) και Clearfil S3 ( $p<0.001$ , 95% CI:91.10, 184.52) (εικ.6γ). Οι συγκολλητικοί παράγοντες Clearfil SE και Clearfil S3 δεν είχαν στατιστικά

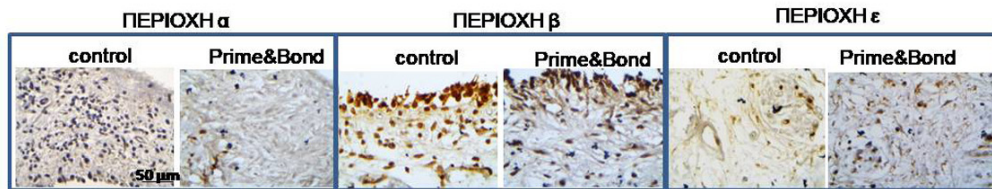


σημαντική επίδραση στα επίπεδα του ERdj5 συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Συμπερασματικά, τα επίπεδα του ERdj5 επηρεάστηκαν σημαντικά κυρίως στην ομάδα Prime&Bond και Dycal: μειώθηκαν στην περιοχή εφαρμογής στην ομάδα Prime&Bond, ενώ αυξήθηκαν στην παρακείμενη της εφαρμογής περιοχή στην ομάδα Prime&Bond και Dycal.

### Επίπεδα του ERdj5



**δ**

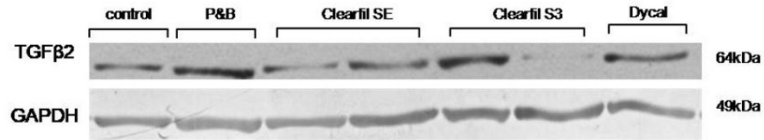


**Εικ.6.** Προσδιορισμός των επιπέδων της ERdj5 σε τομές πλφού. **(α)** Αντιπροσωπευτική εικόνα Western blot. GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη ελέγχου. **(β)** Ποσοτικοποίηση των δεδομένων από το Western blot. Στο ιστόγραμμα τα αποτελέσματα φαίνονται ως λόγος της μέσης τιμής της οπτικής πυκνότητας της ERdj5 προς την αντίστοιχη GAPDH  $\pm$  standard error of mean (SEM) και είναι εκφρασμένα ως % των επιπέδων της ERdj5 στην ομάδα ελέγχου. Το \* δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. **(γ)** Ποσοτικοποίηση των επιπέδων της ERdj5 σε διαφορετικές περιοχές του πλφού (περιοχές α, β, γ, δ, ε, απεικονίζονται με διαφορετικού χρώματος μπάρες). Ο μέσος αριθμός των θετικών κυττάρων σε κάθε περιοχή  $\pm$  standard error of mean (SEM) είναι εκφρασμένος ως % του μέσου αριθμού των θετικών κυττάρων στην αντίστοιχη περιοχή της ομάδας ελέγχου. Το \* δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. **(δ)** Αντιπροσωπευτικές ανοσοϊστοχημικές εικόνες προσδιορισμού της ERdj5 σε τομές παραφίνης από την ομάδα ελέγχου και την ομάδα Prime&Bond χρωσμένες με αιματοξυλίνη.

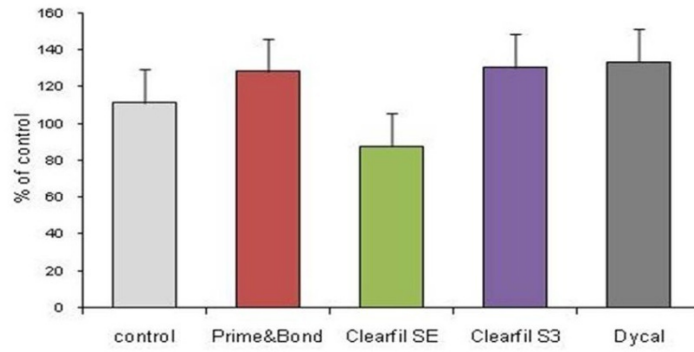
Τα συνολικά επίπεδα του TGFβ2 σε ολόκληρη την τομή του πλφού, όπως ποσοτικοποιήθηκαν με την ανοσοσύπωση κατά Western, δεν διέφεραν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό μεταξύ των ομάδων (Εικ.7α,β). Ωστόσο, τα δεδομένα της ανοσοϊστοχημείας, με μέτρηση θετικά βαμμένων κυττάρων στις πέντε ξεχωριστές περιοχές του πλφού, έδειξαν στατιστικά σημαντική επίδραση των παραγόντων στην περιοχή εφαρμογής τους ( $F_{(28422.04;16)}=4.759$ ,  $p=0.016$ ) (Εικ.7γ,δ). Η post-hoc ανάλυση έδειξε ότι τα επίπεδα του TGFβ2 στην περιοχή εφαρμογής (#α) ήταν μειωμένα στις ομάδες Prime&Bond ( $p=0.010$ , 95% CI:23.07, 137.27), Clearfil SE ( $p=0.016$ , 95% CI:14.08, 114.80), Clearfil S3 ( $p=0.012$ , 95% CI:16.61, 109.86) και Dycal ( $p=0.015$ , 95% CI:14.19, 107.44), σε σχέση με την αντίστοιχη περιοχή της ομάδας ελέγχου (Εικ.7γ,δ). Επομένως, η εφαρμογή των συγκολλητικών παραγόντων που εξετάστηκαν, αλλά και του Dycal, είχε ως αποτέλεσμα, μείωση των επιπέδων του αυξητικού παράγοντα TGFβ2, αποκλειστικά ωστόσο στην περιοχή εφαρμογής τους.

### Επίπεδα του TGFβ2

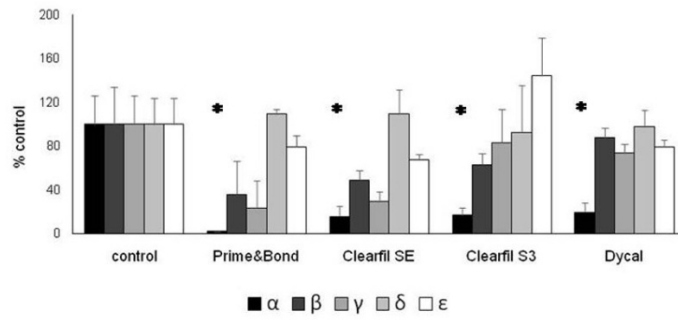
**α**



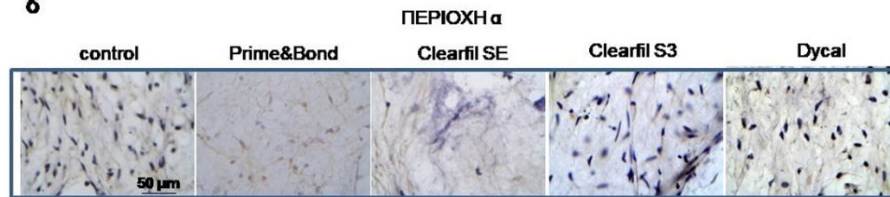
**β**



**γ**



**δ**



**Εικ.7.** Προσδιορισμός των επιπέδων του TGFβ2 σε τομές πλφού. **(α)** Αντιπροσωπευτική εικόνα Western blot. GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη ελέγχου. **(β)** Ποσοτικοποίηση των δεδομένων από το Western blot. Στο ιστόγραμμα τα αποτελέσματα φαίνονται ως λόγος της μέσης τιμής της οπτικής πυκνότητας του TGFβ2 προς την αντίστοιχη GAPDH  $\pm$  standard error of mean (SEM) και είναι εκφρασμένα ως % των επιπέδων του TGFβ2 στην ομάδα ελέγχου. Το \* δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. **(γ)** Ποσοτικοποίηση των επιπέδων του TGFβ2 σε διαφορετικές περιοχές του πλφού (περιοχές α, β, γ, δ, ε, απεικονίζονται με διαφορετικού χρώματος μπάρες). Ο μέσος αριθμός των θετικών κυττάρων σε κάθε περιοχή  $\pm$  standard error of mean (SEM) είναι εκφρασμένος ως % του μέσου αριθμού των θετικών κυττάρων στην αντίστοιχη περιοχή της ομάδας ελέγχου. Το \* δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. **(δ)** Αντιπροσωπευτικές ανοσοϊστοχημικές εικόνες προσδιορισμού του TGFβ2 σε τομές κρυοτόμου χρωσμένες με αιματοξυλίνη.

## Συζήτηση

Τα συγκολλητικά συστήματα, ειδικά εκείνα των τελευταίων γενιών, έχουν προταθεί ως πιθανά υλικά που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη για την άμεση κάλυψη του πολφού, δεδομένου ότι η συγκολλητική τους ικανότητα με οδοντικούς ιστούς επιτρέπει την παρεμπόδιση τη βακτηριακής μικροδιείσδυσης. Παραμένουν ωστόσο ανοιχτά τα ερωτήματα που αφορούν τη βιοσυμβατότητα των υλικών αυτών αλλά και την αποτελεσματικότητά τους στη θεραπεία ζωντανού πολφού. Από τη άλλη πλευρά, το υδροξειδίο του ασβεστίου, το οποίο είναι γνωστό για τα πλεονεκτήματά του, όπως χαμηλή κυτταροτοξικότητα και ικανοποιητική αντιμικροβιακή δράση, παραμένει στην κλινική πράξη ως καθιερωμένο υλικό για την άμεση κάλυψη του πολφού (Kitasako et al, 2000; Schuurs et al, 2000; Nowicka et al, 2016; Silva et al, 2013).

Η επίδραση των συγκολλητικών παραγόντων συνθέτων ρητινών στο σύμπλεγμα οδοντίνης-πολφού αφορά ένα σύνολο μοριακών αλληλεπιδράσεων, το οποίο σε μεγάλο βαθμό δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Ήδη στις μέρες μας είναι γνωστό ότι τα βασικά μονομερή και τα συν-μονομερή των συγκολλητικών συστημάτων, καθώς και το φωσφορικό οξύ μπορούν να είναι τοξικά για τα κύτταρα του πολφού (Kim et al, 2015; Hanks et al, 1991; Yoshii, 1997; Pagoria et al, 2005; Morisbak et al, 2015; Samuelsen et al, 2007; Pawlowska et al, 2010; Chang et al, 2010; Li et al, 2012; Cavalcanti et al, 2005; Pameijer & Stanley, 1998). Έχει φανεί, επίσης, ότι τα συστατικά των συγκολλητικών παραγόντων μπορούν, ανάμεσα σε άλλα, να διαταράξουν την κυτταρική οξειδοαναγωγική ισορροπία, γεγονός που με τη σειρά του μπορεί να επιφέρει αύξηση των επιπέδων ελεύθερων ριζών και την επακόλουθη βλάβη του κυττάρου, όπως αναστολή του κυτταρικού κύκλου, απόπτωση και νέκρωση (Demirci et al, 2008; Gallorini et al, 2014; Shackelford et al, 2000; Barzilay & Yamamoto, 2004; Boonstra & Post, 2004). Ωστόσο, παρά τα ερευνητικά δεδομένα σε ό,τι αφορά την τοξικότητα των μεμονωμένων συστατικών των συγκολλητικών παραγόντων στα κύτταρα του πολφού, ο βαθμός ενεργοποίησης των παραπάνω

μοριακών μηχανισμών στον πολφύ, υπό την επίδραση ολοκληρωμένων συστημάτων συγκόλλησης, δεν έχει ακόμα εξεταστεί.

Η παρούσα μελέτη εξέτασε την πρώιμη επίδραση τριών διαφορετικών συγκολλητικών συστημάτων συνθέτων ρητινών και πάστας υδροξειδίου του ασβεστίου (εμπορική μορφή Dycal), σε τομές πολφού σε θεραπευτικό μέσο της καλλιέργειας. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε με την ομάδα ελέγχου (τομές πολφού στις οποίες δεν εφαρμόστηκε συγκολλητικός παράγοντας ή πάστα υδροξειδίου του ασβεστίου) και έγινε προσπάθεια ταξινόμησης των παραγόντων που εξετάστηκαν ως προς το βαθμό που μπορούσαν να διαταράξουν τη λειτουργία των κυττάρων του πολφού. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η υπόθεση εργασίας απορρίπτεται γιατί οι κυτταρικές αποκρίσεις σε όλες τις πειραματικές ομάδες διέφεραν σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και πρόσθετα, ο κάθε παράγοντας που εξετάστηκε είχε διαφορετική επίδραση στα κύτταρα του πολφού.

Δεδομένου του σημαντικού ρόλου που παίζει το μικροπεριβάλλον του ζωντανού πολφού στις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις, πραγματοποιήθηκε *ex vivo* μελέτη τομών του πολφού. Η διατήρηση της ζωτικότητας του πολφού σε συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας για μερικές μέρες επιτρέπει τη μελέτη ορισμένων πρώιμων αποκρίσεων του συμπλέγματος οδοντίνης-πολφού μετά την εφαρμογή παραγόντων άμεσης κάλυψης (Magloire et al, 1982; Melin et al, 2000; Lucchini et al, 2002; Fernandes et al, 2008). Η μελέτη τέτοιων πρώιμων αποκρίσεων μπορεί αφενός να δώσει πληροφορίες σχετικές με τον πολύπλοκο μηχανισμό λειτουργίας του ίδιου του συμπλέγματος, αφετέρου να συμβάλλει στη δυνατότητα πρόβλεψης της έκβασης της άμεσης κάλυψης του πολφού.

Στην παρούσα μελέτη, η διατήρηση της ζωτικότητας του πολφού επιβεβαιώθηκε με τη χρώση MTT, ενώ η ανοσοϊστοχημική μελέτη επέτρεψε το χωροταξικό προσδιορισμό των αποκρίσεων του πολφού στους διαφορετικούς παράγοντες κάλυψης. Συγκεκριμένα, η χρώση MTT έδειξε ότι όλοι οι συγκολλητικοί παράγοντες, καθώς και το Dycal, μείωσαν τη ζωτικότητα του πολφού στην περιοχή εφαρμογής τους, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο, οι περιοχές νέκρωσης ήταν πιο εκτεταμένες στην περίπτωση των συγκολλητικών συστημάτων σε σχέση με την



αντίστοιχη περιοχή στην ομάδα Dycal. Το γεγονός αυτό μπορεί σε ένα βαθμό να οφείλεται στη χρήση φωσφορικού οξέος στην ομάδα Prime&Bond και την οξύτητα του ίδιου του συγκολλητικού παράγοντα (Costa et al, 1999; Schuurs et al, 2000; Pamejer & Stanley, 1998) καθώς και στη διάχυση κυτταροτοξικών συστατικών των συγκολλητικών συστημάτων στον πολφό (Cavalcanti et al, 2005; Elias et al, 2015; Tuncer et al, 2012; Nowicka et al, 2016). Η εφαρμογή της χρώσης MTT σε προηγούμενες μελέτες έχει δείξει ότι τόσο ο ενεργοποιητής (primer), όσο και η συγκολλητική ρητίνη (bond) του Clearfil SE μειώνουν τη ζωτικότητα των κυττάρων (Lee Y et al, 2016; Porto et al, 2011). Επιπλέον, η περίσσεια υγρασίας που ενδεχομένως παραμένει μετά το ξέπλυμα του φωσφορικού οξέος στην ομάδα Prime&Bond, η παρουσία νερού στα συγκολλητικά συστήματα Clearfil SE (primer) και Clearfil S3, καθώς και η εγγενής υγρασία του πολφού σχετίζονται, επίσης, με τον ατελή πολυμερισμό και την αυξημένη διάχυση κυτταροτοξικών παραγόντων στον πολφό (Accorinte et al, 2005α; Paul et al, 1999; Silva et al, 2013; Spencer & Wang, 2002). Στην περίπτωση του Dycal, η περιορισμένης έκτασης επίδραση στη ζωτικότητα των κυττάρων έχει ήδη πιστοποιηθεί σε προηγούμενες μελέτες, οι οποίες αναφέρουν τοπική νέκρωση του πολφού εξαιτίας της υψηλής αλκαλικότητάς του (Cavalcanti et al, 2005; Pereira et al, 1980; Lombardi et al, 1991; de Freitas 1982). Η απουσία οποιασδήποτε νέκρωσης στην περίπτωση της ομάδας ελέγχου υποδηλώνει ότι, στο παρόν πειραματικό μοντέλο, ούτε ο χειρισμός των ιστών ούτε οι συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας επηρέασαν τη ζωτικότητα του πολφού.

Η μείωση της ζωτικότητας του πολφού μετά την εφαρμογή των συγκολλητικών συστημάτων και του Dycal επαληθεύτηκε και με την ιστολογική εικόνα του πολφού (χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης) καθώς και με τη μείωση των επιπέδων της Βιμεντίνης στις περιοχές εφαρμογής των παραγόντων κάλυψης. Η Βιμεντίνη είναι ένα ενδιάμεσο ινίδιο των μεσεγχυματικών κυττάρων, η οποία, αν και δεν είναι ειδική των κυττάρων του πολφού, έχει χρησιμοποιηθεί ως πιθανός ποιοτικός δείκτης της ακεραιότητας και της ιστικής αναγέννησης του πολφού (Murakami et al, 2012; Ivaska et al, 2007; Minin & Pallairi, 2008). Στην παρούσα μελέτη, η μείωση των επιπέδων Βιμεντίνης στις περιοχές εφαρμογής των παραγόντων κάλυψης συμπίπτει με τη μειωμένη ζωτικότητα των κυττάρων. Επιπλέον, ο βαθμός της απόπτωσης ήταν

αυξημένος στην περιοχή εφαρμογής των Prime&Bond, Clearfil SE και Dycal, σε σχέση με την αντίστοιχη περιοχή στην ομάδα ελέγχου. Αυξημένη απόπτωση παρατηρήθηκε επίσης σε περιοχές προσκείμενες σε εκείνη της εφαρμογής στις ομάδες Prime&Bond και Clearfil SE. Όσον αφορά στο Clearfil SE, οι παραπάνω παρατηρήσεις συμφωνούν με προηγούμενη μελέτη που έδειξε ότι, η εφαρμογή Clearfil SE Bond προκάλεσε απόπτωση των κυττάρων του πολφού και τη νέκρωσή τους (Lee BS et al, 2015). Μια άλλη μελέτη αναφέρει ότι το Clearfil SE primer είναι κυτταροτοξικό για τις οδοντινοβλάστες, επειδή προκαλεί αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (Lee Y et al, 2016). Η αυξημένη απόπτωση στις ομάδες Prime&Bond, Clearfil SE και Dycal θα μπορούσε να αποδοθεί στο πολύ χαμηλό και το πολύ υψηλό pH των υλικών αυτών (Πίνακας 1). Έχει φανεί σε προηγούμενες μελέτες ότι η διαταραχή της ομοιόστασης του pH (εξω- και εσω-κυτταρική αύξηση οξύτητας ή αλκαλικότητας) σχετίζεται με την απόπτωση (Lagadic-Gossmann et al, 2004; Tannock & Rotin, 1989; Boyer & Tannock, 1992). Μικρή μόλις πτώση του ενδοκυτταρικού pH (από 7.4 σε 7.2-6.7) μπορούσε να οδηγήσει σε αυξημένη απόπτωση HL-60 κυττάρων (Park et al, 1996). Ίσως το γεγονός ότι η εφαρμογή του Clearfil S3 δε συμπεριλαμβάνει τη χρήση ισχυρού οξέος (όπως στην ομάδα Prime&Bond) ή όξινου ενεργοποιητή (primer) (όπως στην ομάδα Clearfil SE), μπορεί να εξηγήσει την καλύτερη συμπεριφορά του Clearfil S3 στην απόπτωση, σε σχέση με τους άλλους συγκολλητικούς παράγοντες. Εξάλλου έχει φανεί ότι ο ενεργοποιητής στο σύστημα Clearfil SE είναι περισσότερο κυτταροτοξικός σε σχέση με τη συγκολλητική ρητίνη του ίδιου συστήματος, πιθανόν επειδή δεν πολυμερίζεται άμεσα κατά την εφαρμογή του (Tuncer et al, 2012; Korsuwannawong et al, 2012).

Είναι ήδη γνωστό ότι μεμονωμένα συστατικά συγκολλητικών παραγόντων, όπως HEMA, TEGDMA, Bis-GMA, MDP και καμφοροκινόνη, μειώνουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της γλουταθειόνης, ενώ παράλληλα αυξάνουν τα επίπεδα ελεύθερων ριζών οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες, είναι υπεύθυνα για τις οξειδωτικές βλάβες του DNA και της σχετιζόμενης με αυτό αναχαίτισης του κυτταρικού κύκλου κ.α. Όλα τα παραπάνω είναι γεγονότα που παίζουν ρόλους-κλειδιά στη διαδικασία της απόπτωσης (Cann & Hicks, 2007; Krifka et al, 2013; Pagoria et al, 2005; Morisbak et al, 2015; Samuelsen et al, 2007; Pawlowska et al, 2010; Chang et al, 2010; Li et al, 2012; Paranjpe et al, 2005; Gallorini et al, 2014; Spagnuolo et al, 2006). Επιπλέον, η

κυτταροτοξικότητα των συγκολλητικών συστημάτων μπορεί να αυξηθεί όχι μόνο εξαιτίας παρουσίας οξέων αλλά και εξαιτίας συνεργικής δράσης των ίδιων των συστατικών του (Durner et al, 2012; Ratanasathien et al, 1995; Hashieh et al, 1999). Ωστόσο, ο διαχωρισμός φάσεων που παρατηρείται στα συγκολλητικά συστήματα και η χρήση ολοκληρωμένων συγκολλητικών συστημάτων, και όχι των μεμονωμένων συστατικών τους, καθιστά δύσκολη την εξήγηση των συχνά αντικρουόμενων αποτελεσμάτων που προκύπτουν.

Οι αλλαγές του οξειδοαναγωγικού δυναμικού των κυττάρων (οξειδωτικό στρες) είναι γνωστό ότι μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) (Ron & Walter, 2007). Στην περίπτωση βλάβης του πολφού, η αυξημένη εκκριτική δραστηριότητα των οδοντινοβλαστών και αδιαφοροποίητων μεσεγχυματικών κυττάρων του πολφού αυξάνει την πίεση που ασκείται στο μηχανισμό ποιοτικού ελέγχου του ΕΔ, με αποτέλεσμα το κυτταρικό στρες. Η προσαρμοστική λειτουργία του κυττάρου, ονομαζόμενη απάντηση του ΕΔ στη λανθασμένη αναδίπλωση πρωτεϊνών, πραγματοποιείται με τη βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών του ΕΔ (chaperons) ανάμεσα στις οποίες το ERdj5 παίζει έναν από τους πλέον σημαντικούς ρόλους (Ron & Walter, 2007). Έχει φανεί ότι η αυξημένη έκφραση του ERdj5 σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και ενεργοποίησης του μηχανισμού απάντησης του ΕΔ στη λανθασμένη αναδίπλωση πρωτεϊνών μπορεί να πυροδοτήσει το μηχανισμό της απόπτωσης του κυττάρου (Thomas & Spyrou, 2009). Μέχρι σήμερα, η μεταβολή της έκφρασης του ERdj5 στα κύτταρα του πολφού μετά την εφαρμογή παραγόντων άμεσης κάλυψής του δεν έχει μελετηθεί. Στην παρούσα μελέτη, η μείωση της έκφρασης του ERdj5 στην περιοχή εφαρμογής του Prime&Bond πιθανόν να οφείλεται στην εκτεταμένη καταστροφή του ιστού στην περιοχή αυτή. Από την άλλη, τα επίπεδα του ERdj5 αυξήθηκαν στις περιοχές τις προσκείμενες σε αυτήν της εφαρμογής, τόσο στην ομάδα Prime&Bond, όσο και στην ομάδα Dycal, γεγονός που υποδηλώνει τη διαφοροποίηση της επίδρασης των παραπάνω παραγόντων σε διαφορετικά σημεία του πολφού. Η παρατήρηση αυτή φαίνεται να εξηγεί και την απουσία σημαντικών διαφορών στα συνολικά επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής σε ολόκληρο τον πολφό (ανάλυση Western Blot). Η απουσία αλλαγών στα συνολικά επίπεδα του ERdj5 στον πολφό μετά την εφαρμογή των παραγόντων

κάλυψης, υποδηλώνει τη μη γενικευμένη τοξικότητά τους. Πιθανόν η ετερογενής και χωροταξική αλλαγή της έκφρασης του ERdj5 μπορεί να εξηγηθεί με τη διαφορετική σύνθεση των παραγόντων κάλυψης που εξετάστηκαν, η οποία είχε ως αποτέλεσμα τη διαφορετικού βαθμού απελευθέρωση ελεύθερων ριζών. Το πολύ χαμηλό και το πολύ ψηλό pH του φωσφορικού οξέος και του Dycal, αντίστοιχα, θα μπορούσε να εξηγήσει το πιο εκτεταμένο οξειδωτικό στρες στις ομάδες αυτές. Επιπλέον, η πιθανόν αυξημένη διάχυση του υδρόφιλου μονομερούς HEMA στην ομάδα Prime&Bond θα μπορούσε να εξηγήσει την αύξηση των επιπέδων ERdj5 στην ομάδα αυτή. Στη δική τους μελέτη οι Diamanti και συν. έδειξαν ότι η εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων HEMA σε καλλιέργεια κυττάρων του πολφού οδήγησε στην αύξηση των επιπέδων του ERdj5 (Diamanti et al, 2013). Ωστόσο οι διαφορετικές πειραματικές συνθήκες, καθώς και το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκε ένα μεμονωμένο συστατικό συγκολλητικού συστήματος, δεν επιτρέπει την ασφαλή σύγκριση ανάμεσα στις δύο μελέτες.

Ο TGFβ2 είναι μία από τις τρεις ισομορφές του TGFβ που συναντάται στα πολφικά κύτταρα και την οδοντίνη του δοντιού και φαίνεται να συμβάλλει στην επουλωτική διαδικασία (Finkelman et al, 1990; Ahn et al, 2015; Cassidi et al, 1997). Οι μοριακοί μηχανισμοί επούλωσης του πολφού, όπως η επαγωγή παραγωγής επανορθωτικής οδοντίνης και η διαφοροποίηση μεσεγχυματικών κυττάρων του πολφού σε κύτταρα δίκην-οδοντινοβλαστών από τον TGFβ1 έχουν μελετηθεί, είτε μετά την απελευθέρωσή του από την οδοντίνη, είτε μετά την εφαρμογή του απευθείας στον πολφό. Αύξηση των επιπέδων ορισμένων μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGFβ, όπως TGFβR1, -2 και SMADs, έχει παρατηρηθεί τόσο σε οδοντινοβλάστες όσο και σε κύτταρα δίκην-οδοντινοβλαστών, στην περίπτωση που η επουλωτική διαδικασία του πολφού συμπεριλαμβάνει την παραγωγή επανορθωτικής οδοντίνης (Hwang et al, 2008; Laurent et al, 2012). Ωστόσο, εξ όσων γνωρίζουμε, δεν έχει μελετηθεί η έκφραση της TGFβ2 ισομορφής στον πολφό μετά την άμεση κάλυψή του. Στην παρούσα μελέτη, τα μειωμένα επίπεδα του TGFβ2 στην περιοχή εφαρμογής παραγόντων κάλυψης σε όλες τις πειραματικές ομάδες, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως μείωση της επουλωτικής ικανότητας του πολφού στη συγκεκριμένη

περιοχή και ως μειωμένη δυνατότητα σχηματισμού επανορθωτικής οδοντίνης. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω σε ό,τι αφορά τη μειωμένη ζωτικότητα των κυττάρων και την ιστική ακεραιότητα στην ίδια περιοχή του πολφού.

Η παρούσα μελέτη παρέχει ορισμένα δεδομένα σε ό,τι αφορά την επίδραση τριών διαφορετικών συγκολλητικών συστημάτων και του  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  στον πολφό δοντιού, καθώς μελετά τις πρώιμες αποκρίσεις του στους παραπάνω παράγοντες χρησιμοποιώντας ένα πειραματικό μοντέλο που πλησιάζει τις *in vivo* συνθήκες. Το *ex vivo* μοντέλο επιτρέπει τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων κυττάρων-υλικών σε συνδυασμό με τις κυτταρικές/ιστικές συνιστώσες και προσομοιάζει καλύτερα το περιβάλλον στο σύμπλεγμα οδοντίνης-πολφού. Ταυτόχρονα, επειδή πραγματοποιείται σε ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες δεν επηρεάζεται από παραμέτρους όπως, διαφοροποιήσεις ως προς την επουλωτική ικανότητα του κάθε οργανισμού ή ως προς το περιβάλλον της στοματικής κοιλότητας. Η επουλωτική ωστόσο ικανότητα του κάθε οργανισμού και το ιδιαίτερο μικροπεριβάλλον της στοματικής κοιλότητας είναι εκείνες οι περιοριστικές παράμετροι που δεν επιτρέπουν με ασφάλεια την απόλυτη αναγωγή του μοντέλου αυτού σε *in vivo* συνθήκες. Εξάλλου, η θεραπεία ζωντανού πολφού έχει νόημα σε έδαφος δοντιού προσβεβλημένου από τερηδόνα, όπου οι επικρατούσες συνθήκες διαφέρουν από εκείνες του υγιούς δοντιού. Η παράμετρος αυτή δεν συμπεριλήφθηκε στο μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε και αποτελεί ένα ακόμα περιορισμό της μελέτης. Περαιτέρω μελέτες σε συστήματα τρισδιάστατης καλλιέργειας ολόκληρου δοντιού θα βοηθήσουν στην ακριβέστερη αποτίμηση των επιπτώσεων στον πολφό από την έκθεση σε συγκολλητικούς παράγοντες.

Ο συνδυασμός μεθόδων που ακολουθήθηκε στη μελέτη λειτούργησε συμπληρωματικά και έδωσε τη δυνατότητα να επαληθευτούν τα επιμέρους ευρήματα. Η εφαρμογή της ανοσοοστίωσης κατά Western, για την εκτίμηση της επίδρασης των παραγόντων κάλυψης πρόσφερε τη δυνατότητα να εξεταστεί το σύνολο του πολφικού ιστού. Η ανοσοϊστοχημική παράλληλα εντόπιση των ίδιων αντισωμάτων στις επιμέρους περιοχές του πολφού πρόσφερε τη δυνατότητα της πιο

συγκεκριμένης τοπογραφικής εκτίμησης της επίδρασης των παραγόντων κάλυψης. Η άμεση οπτική εκτίμηση της ζωτικότητας του πολφικού ιστού με τη χρώση MTT επαληθεύτηκε με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, ενώ η μέθοδος TUNEL έδωσε επιπλέον στοιχεία που αφορούσαν την απόπτωση των κυττάρων στις ίδιες περιοχές εφαρμογής των παραγόντων κάλυψης.

Στην παρούσα εργασία δεν πραγματοποιήθηκε η συσχέτιση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των πολύπλοκων και διαφορετικών συστημάτων που χρησιμοποιήθηκαν με τις βιολογικές παραμέτρους που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, ο σχεδιασμός της μελέτης δεν μπορούσε να δώσει απάντηση στα ερωτήματα όπως κατά πόσο η διαφορετική οξύτητα των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν επηρέασε τις πρώιμες αποκρίσεις του πολφού ή κατά πόσο ο φωτοπολυμερισμός των συγκολλητικών συστημάτων, δεδομένης της αύξησης της θερμοκρασίας που προκαλεί στον πολφό, μπορούσε να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Επίσης, το γεγονός ότι μελετήθηκαν πολύπλοκα συστήματα με διαφορετική χημεία και τρόπο εφαρμογής, δεν επιτρέπει τη διαφοροποίηση της επίδρασης ενός συγκεκριμένου συστατικού τους (π.χ του φωσφορικού οξέος ή του Prime&Bond, του Clearfil SE primer ή του Clearfil SE Bond) στις παραμέτρους που μελετήθηκαν, αφήνοντας πολλά ανοιχτά ερωτήματα σε σχέση με το μηχανισμό δράσης των συστημάτων αυτών στον πολφό.

Λαμβάνοντας υπόψη τους περιορισμούς, τα αποτελέσματα της μελέτης αναδεικνύουν την πολυπλοκότητα των πολφικών αποκρίσεων σε διαφορετικά υλικά άμεσης κάλυψης. Παραμένουν πολλά ανοιχτά ερωτήματα που αφορούν πιο μακροχρόνιες επιπτώσεις της εφαρμογής συγκολλητικών συστημάτων απευθείας στον πολφό, καθώς και ερωτήματα που σχετίζονται με τη μελέτη, σε μοριακό επίπεδο, του επουλωτικού μηχανισμού του πολφού, ο οποίος ακόμα και σήμερα παραμένει αδιευκρίνιστος. Για το λόγο αυτό, είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθεί περισσότερη έρευνα προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός της κυτταροτοξικότητας των συγκολλητικών συστημάτων, όταν αυτά εφαρμόζονται άμεσα στον πολφό, καθώς και της επουλωτικής του ικανότητας μετά την άμεση κάλυψή του.

Σε κλινικό επίπεδο, η χρήση των συγκολλητικών συστημάτων, ιδιαίτερα εκείνων που συνοδεύονται από τη χρήση οξέων, δεν μπορεί να θεωρηθεί ακόμα ασφαλής προσέγγιση στη θεραπεία του ζωντανού πολφού. Η άμεση κάλυψη του πολφού με  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , αν και δεν στερείται μειονεκτημάτων, εκτιμάται, και με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ως πιο ασφαλής για τη ζωτικότητά του.

## Συμπεράσματα

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, συμπεραίνονται τα εξής:

1. Οι πρώιμες αποκρίσεις του οδοντικού πολφού σε συγκολλητικούς παράγοντες Prime&Bond, Clearfil SE και Clearfil S3 περιλαμβάνουν απώλεια κυτταρικής ζωτικότητας (τοπική νέκρωση του ιστού), αύξηση της απόπτωσης και μείωση των επιπέδων Βιμεντίνης, TGFβ2 και ERDj5, που συνάδουν με αυξημένο κυτταρικό στρες και - πρόσκαιρα - μειωμένη ικανότητα ιστικής επιδιόρθωσης.
2. Η εφαρμογή του Prime&Bond και φωσφορικού οξέος είχε την πλέον καταστροφική επίδραση στον ιστό, ακολουθούμενη από τα Clearfil SE, Clearfil S3.
3. Η εφαρμογή του Dycal είχε ως αποτέλεσμα δημιουργία περιορισμένης έκτασης νεκρωτική ζώνη και ιστική βλάβη, που περιοριζόταν στο σημείο της τοποθέτησής του.
4. Ο συνδυασμός μεθόδων που ακολουθήθηκε στη μελέτη επέτρεψε να επιβεβαιωθούν τα επιμέρους ευρήματα και λειτούργησε ενισχυτικά στη διατύπωση των τελικών συμπερασμάτων.



## **Δελτίο συγκατάθεσης για συμμετοχή σε έρευνα**

ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

### **ΑΥΞΩΝ ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΡΕΥΝΑΣ**

**Τίτλος Προγράμματος:** Ex vivo μελέτη των κυτταρικών αποκρίσεων του ανθρώπινου πολφού σε συγκολλητικούς παράγοντες κατά τα πρώιμα στάδια της διεργασίας επούλωσης

**Σχολή/ Τμήμα:** Εργαστήριο Οδοντικής Χειρουργικής, Τομέας Οδοντικής Παθολογίας και Θεραπευτικής,

Οδοντιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

**Υπεύθυνος ερευνητής:** Κακάμπουρα Αφροδίτη, τηλ: 2107461208, fax: 2107461162

**Συνεργάτες ερευνητές:** Ποιμένοβα Άννα, Ραχιώτης Χρίστος, Κερεζούδης Νικόλαος, Κιτράκη Ευθυμία

Σας ζητείται να συμμετέχετε σε ένα ερευνητικό πρόγραμμα που γίνεται με τη στήριξη του Πανεπιστημίου Αθηνών. Οι ακόλουθες πληροφορίες παρέχονται προς ενημέρωσή σας προκειμένου να αποφασίσετε αν επιθυμείτε να συμμετέχετε.

## **1. Σκοπός**

**Σκοπός αυτής της έρευνας είναι να εξεταστεί σε εξαχθέντα δόντια (φρονιμίτες) κατά πόσο η εφαρμογή τριών διαφορετικών συγκολλητικών συστημάτων συνθέτων ρητινών στον πολφό – κλινική περίπτωση όταν η βλάβη λόγω τερηδόνας έχει προχωρήσει βαθιά μετά στην οδοντίνη έως τον πολφό - μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα του πολφού για επούλωση.**

## **2. Διαδικασίες**

Η μελέτη θα πραγματοποιηθεί σε τομές υγιών ανθρώπινων τρίτων γομφίων (φρονιμίτες) που θα εξαχθούν στην Κλινική Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής της Οδοντιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών. Στη μελέτη θα συμμετέχουν ασθενείς στους οποίους από την Κλινική Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής θα έχει προγραμματιστεί η εξαγωγή του/των έγκλειστων τρίτων γομφίων. Από κάθε ασθενή θα ζητηθεί η έγγραφη συγκατάθεσή του για τη χρησιμοποίηση των δοντιών. Από την έρευνα δε θα αποκλειστούν ασθενείς λόγω της ηλικίας, φύλου ή εθνικής προέλευσης. Ο αριθμός των ασθενών που θα συμμετάσχουν στην έρευνα θα εξαρτηθεί από τον αριθμό των δοντιών που θα συλλεχτεί από κάθε ασθενή, μέχρι τη συμπλήρωση του συνολικού δείγματος (~ 30 δόντια).

## **3. Εξαιρέσεις**

Δεν μπορείτε να συμμετάσχετε σε αυτήν την έρευνα αν υπάρχει οποιαδήποτε αντένδειξη εξαγωγής των εγκλειστων τρίτων γομφίων σύμφωνα με την εκτίμηση των μελών ΔΕΠ της Κλινικής Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής.

#### **4. Κίνδυνοι και ενοχλήσεις**

Αυτή η μελέτη δεν περιλαμβάνει κάποιους κινδύνους ή ενοχλήσεις για εσάς.

#### **5. Κόστος έρευνας**

Δεν προβλέπεται κάποιο κόστος για τη συμμετοχή σας στην έρευνα αυτή, εκτός από το κόστος της εξαγωγής που αποφασίζει η Κλινική Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής.

#### **6α. Οφέλη**

Αν και δε θα υπάρξει άμεσο όφελος από τη συμμετοχή σας στην έρευνα, με τη συγκατάβασή σας για την αξιοποίηση των εξαχθέντων δοντιών, βοηθάτε στην πραγματοποίηση της ερευνητικής εργασίας, που αποσκοπεί στην προσφορά νέων γνώσεων στην επιστήμη της Οδοντιατρικής, με απώτερο σκοπό τη βελτίωση της οδοντιατρικής θεραπείας των ασθενών.

#### **6β. Πληρωμή**

Καμία πληρωμή δε θα πραγματοποιηθεί για τη συμμετοχή σας.

## **7. Εμπιστευτικότητα**

Κρατείται πλήρης εμπιστευτικότητα για όλα τα αρχεία. Πάραυτα, δεν υπάρχει εγγύηση ότι αυτές οι πληροφορίες δε μπορούν να γνωστοποιηθούν σε δικαστήριο ή άλλη νομική διαδικασία. Ωστόσο, ακόμα και σε αυτή την περίπτωση, το όνομά σας δε θα αναφέρεται σε καμία αναφορά ή δημοσίευση.

## **8. Δικαίωμα μη-συμμετοχής ή απόσυρσης**

Μπορείτε να αποσυρθείτε από το πρόγραμμα όποτε εσείς επιθυμείτε. Η απόσυρσή σας δεν επηρεάζει τη δυνατότητά σας να λαμβάνετε θεραπεία από την Οδοντιατρική Σχολή ή άλλα προνόμια τα οποία έχετε, ούτε η άρνησή σας να συμμετάσχετε στο πρόγραμμα επηρεάζει τη δυνατότητά σας να λαμβάνετε θεραπεία από την Οδοντιατρική Σχολή ή την απολαβή άλλων προνομίων που έχετε.

Ο υπεύθυνος ερευνητής αυτής της έρευνας έχει το δικαίωμα να τερματίσει τη συμμετοχή σας σε οιονδήποτε χρόνο. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μη αναμενόμενη αντίδρασή σας, ή σε μη επιτυχή παρακολούθηση των οδηγιών από εσάς, ή επειδή έχει σταματήσει η έρευνα εξ ολοκλήρου.

## 9. Εγγύηση ότι οι ερωτήσεις έχουν απαντηθεί και θα απαντηθούν

Αν έχετε επιπλέον ερωτήσεις σχετικά με την έρευνα, μπορείτε να επικοινωνήσετε με τον κύριο ερευνητή κ. Κακάμπουρα Αφροδίτη στον αριθμό 2107461208

Αυτό το πρόγραμμα έχει αναθεωρηθεί και έχει εγκριθεί από την Επιτροπή Δεοντολογίας της Οδοντιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Αν υπάρχουν ερωτήσεις οι οποίες αφορούν στην Επιτροπή, μπορείτε να επικοινωνήσετε με τον Πρόεδρο του Τμήματος στον αριθμό (τηλέφωνο επικοινωνίας)..... μέσω του/της κ.....

**Έχω διαβάσει τις ανωτέρω αναφερόμενες πληροφορίες και συμφωνώ να συμμετέχω στην έρευνα. Εκτιμώ ότι θα λάβω αντίγραφο της φόρμας συγκατάθεσης όταν αυτή έχει υπογραφεί.**

Υπογραφή συμμετέχοντα ή νόμιμου κηδεμόνα

Ημερομηνία

Υπογραφή ερευνητή που έλαβε τη συγκατάθεση

Ημερομηνία

## Περίληψη

### Σκοπός:

Ο σκοπός της παρούσας *ex vivo* μελέτης ήταν η εξέταση των πρώιμων κυτταρικών αποκρίσεων του πολφού στην άμεση κάλυψή του με τρία συγκολλητικά συστήματα συνθέτων ρητινών (Prime&Bond NT, Clearfil SE Bond και Clearfil S3 Bond) και το Dycal. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν περιλάμβαναν την ζωτικότητα και την ιστική ακεραιότητα του πολφού, την απόπτωση των κυττάρων του καθώς και την έκφραση της Βιμεντίνης, του ERdj5 και του TGFβ2.

### Υλικά και Μέθοδος:

Τα συγκολλητικά συστήματα, το Dycal και το ρυθμιστικό διάλυμα (DPBS) εφαρμόστηκαν άμεσα σε τομές πολφού ανθρώπινων δοντιών διατηρημένων σε θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας για 4 μέρες. Η εκτίμηση της ζωτικότητας του ιστού κατά τη διάρκεια της παραμονής του σε καλλιέργεια έγινε με την εφαρμογή της χρώσης MTT. Μετά το πέρας των τεσσάρων ημερών, η ακεραιότητα του ιστού εκτιμήθηκε με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, την ανοσοϊστοχημική χρώση και την ανοσοσύπωση κατά Western για τη Βιμεντίνη, καθώς και με τη μέθοδο TUNEL για τον εντοπισμό των αποπτωτικών κυττάρων. Η εκτίμηση του στρες του Ενδοπλασματικού Δικτύου και της ιστικής ανάπλασης πραγματοποιήθηκε με την ανοσοϊστοχημική χρώση και την ανοσοσύπωση κατά Western για την πρωτεΐνη-δείκτη στρες του ενδοπλασματικού δικτύου ERdj5 και τον αυξητικό παράγοντα TGFβ2, αντίστοιχα.

### Αποτελέσματα:

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι οι πρώιμες αποκρίσεις του πολφού στην άμεση κάλυψή του με τους εξεταζόμενους συγκολλητικούς παράγοντες και το Dycal διαφέρουν σημαντικά. Σημαντική μείωση της ζωτικότητας των κυττάρων και διατάραξη της ακεραιότητας του ιστού παρατηρήθηκε στις ομάδες όπου εφαρμόστηκαν τα συγκολλητικά συστήματα. Λιγότερο σημαντική επίδραση είχε η εφαρμογή του Dycal. Εκτεταμένη απόπτωση προκάλεσαν το Clearfil SE και το

Prime&Bond. Το Dycal προκάλεσε περιορισμένη απόπτωση στην περιοχή της εφαρμογής του. Όλα τα συγκολλητικά συστήματα μείωσαν τα επίπεδα της Βιμεντίνης και του TGFβ2 στην περιοχή της εφαρμογής. Τα συνολικά επίπεδα της Βιμεντίνης στον πολφό μειώθηκαν επίσης. Μειωμένα επίπεδα της ERdj5 παρατηρήθηκαν στην περιοχή εφαρμογής του Prime&Bond ενώ αυξημένα επίπεδα της ERdj5 παρατηρήθηκαν στις παρακείμενες περιοχές προς την περιοχή της εφαρμογής του Prime&Bond και του Dycal.

*Συμπεράσματα:*

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν την ανάγκη περαιτέρω διευκρίνησης των τυχόν αρνητικών επιπτώσεων των συγκολλητικών συστημάτων στον οδοντικό πολφό, με τη διενέργεια συγκριτικών μελετών των κυτταρικών αποκρίσεων του πολφού στα χρησιμοποιούμενα συστήματα. *Ex vivo* μοντέλα μελέτης, όπως αυτό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή, θα μπορούσαν να εξυπηρετήσουν αυτόν το στόχο.

## **Anna Poimenova**

PhD candidate, Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, National and Kapodistrian University of Athens, Greece

### **PhD Thesis**

#### **Abstract**

##### *Aim:*

The aim of the study was to investigate ex vivo the early responses of human dental pulp to three different dental adhesive resin systems (Prime&Bond NT/phosphoric acid, Clearfil SE Bond, Clearfil S3 Bond) and Dycal.

##### *Materials and Methods:*

Thirty sound mature impacted third molars, freshly extracted for orthodontic reasons, were selected from patients between 18-30 years old. Immediately after the extraction, 750µm-thick tooth slices were cut with a hard tissue microtome under constant flow of rinsing solution. Three to four longitudinal sequential slices with buccal-lingual direction were performed per tooth and transferred into the culture hood under sterile conditions. The tooth slices were washed extensively carefully dried using sterile paper. They were randomly sorted in five groups for the application of the capping materials. The adhesive systems were applied with a fine adhesive system micro applicator according to the manufacturer's instructions and were polymerized with a LED light-curing unit. The calcium hydroxide was applied with a special Dycal instrument. Shortly afterwards, the slices were placed in 6-well plates with culture medium. The cultures were maintained at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and 95% air for 4 days without medium change. During the culture period, pulp vitality and metabolic activity was monitored via MTT assay immediately upon application (t=0h) and at 24h (t=24h) and 48h in culture. Four days after treatment, the tooth slices were collected for further analysis. Following incubation period, the tooth slices were fixed in paraformaldehyde solution. Afterwards, a number of tooth slices were cryoprotected and removed with a periodontal explorer, embedded in a Tissue-tec medium. Serial sections of 8µm



thickness were cut on a cryostat and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Tooth slices from all groups were also embedded in paraffin. Specifically, upon fixation in 4% PFA, the slices were demineralised in 10% EDTA solution (pH 7.0) for a period of 16wk. For histological analysis, three non-adjacent paraffin sections per tooth slice, per group were stained with hematoxylin-eosin. For evaluation of apoptosis, the ApopTag® Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit was applied on paraffin sections. For immunohistochemical detection of TGF $\beta$ 2, the cryotome sections were incubated in blocking solution. After blocking, the sections were probed with anti-TGF $\beta$ 2 antibody. For immunohistochemical analysis of ERdj5, anti-ERdj5 rabbit Polyclonal was used as the primary antibody. For the quantification of the signal in immunohistochemistry and TUNEL assays, the positive cells were counted using the Image J software. To examine the effect of capping materials on Vimentin, TGF $\beta$ 2 and ERdj5 levels in the entire pulp of each slice, Western blot analysis was performed. Anti-Vimentin mouse monoclonal, anti-TGF $\beta$ 2 rabbit polyclonal, anti-ERdj5 rabbit polyclonal and Anti-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) mouse monoclonal were used as primary antibodies. The protein bands were visualized using DAB or ECL detection reagents. The effect of capping materials on the protein levels of Vimentin, ERdj5 and TGF $\beta$ 2 in the whole pulp, as well as on apoptosis and immunostaining of ERdj5 and TGF $\beta$ 2 in different pulp areas was statistically evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA). Values of  $p < 0.05$  were considered as statistically significant. When appropriate, the LSD test for post-hoc analysis was applied for group comparisons.

### *Results:*

The metabolic activity and the viability of pulp cells, after the application of the capping materials, were visualized by MTT assay. All additives impacted pulp cell vitality in the area of application, compared to the untreated control group. More specifically, in the control group, a uniform purple color, denoting cell vitality was witnessed at all time points tested. In the three groups treated with the resin adhesives, the decreased purple colorization in the coronal area of the pulp, shortly after the treatment ( $t = 0$ ), was indicative of cell damage. A similar, though less expanded, area of damaged tissue was noticed in the group treated with Dycal at  $t = 0\text{h}$ . At 48h post treatment, the decreased purple staining was noticed in a more expanded area than the spot site and

appeared more like a necrotic zone in the groups treated with the three adhesives. No further tissue damage was seen in the Dycal group.

The microscopic examination of hematoxylin-eosin stained sections at the end of the culture period, verified the observations of MTT assay on pulp integrity. In the group treated with Prime&Bond the tissue damage was clearly seen in the application area in all sections, compared to the control group. In the groups treated with Clearfil SE and Clearfil S3, tissue distortion of different extent was also observed. In the group treated with Dycal, the necrotic zone was limited to the application area. Tissue damage due to capping materials was also reflected in Vimentin levels. Vimentin levels in the entire pulp of the tooth slice were significantly affected by the treatment. Subsequent post-hoc analysis showed that Vimentin levels were reduced in the groups treated with Prime&Bond, Clearfil SE and Clearfil S3, compared to the control group. Vimentin levels in Dycal-treated group did not differ from the control.

The effect of the applied dental materials on cell apoptosis was examined using the TUNEL assay. The number of apoptotic pulp cells was measured in five pulp areas. Statistical evaluation of results revealed that apoptosis was more profound in the treatment area of groups Prime&Bond, Clearfil SE and Dycal, compared to the same area of the control group. Post-hoc analysis also showed that the number of apoptotic cells in the treatment area of group Clearfil S3 did not differ from the control and was lower, compared to the same area of groups Prime&Bond, Clearfil SE and Dycal. In the adjacent to the treatment area b, the number of apoptotic cells in the Clearfil SE group was increased compared to the same area of all other groups. In the adjacent to the treatment area (area d), the number of apoptotic cells in the Clearfil SE group was also increased, compared to the same areas in all other groups. The levels of chaperon ERdj5, were assessed as an index of cellular stress in the pulp, by both Western blot analysis and immunohistochemistry. Statistical evaluation of the Western blot data showed no significant effect of treatment. However, statistical analysis of immunohistochemistry data, obtained upon measuring ERdj5 positive cells in the five discrete subregions of the pulp, revealed significant effect of treatment. Post-hoc group comparisons per pulp area showed that levels of ERdj5 were modified in a

treatment- and area-dependent manner. More specifically, ERdj5 levels were significantly reduced in the application area in Prime&Bond group, compared to the control and to the rest experimental groups. Contrariwise, in the same group, ERdj5 levels were increased in the adjacent to the treatment area b and in the central area e, compared to the control, to Clearfil SE, to Clearfil S3 and to Dycal. ERdj5 levels were also increased in the adjacent to the treatment area of the pulp (area d) of Dycal treated-group, compared to the control. Clearfil SE and Clearfil S3 had no effect on ERdj5 levels compared to the control.

The levels of TGFβ2 in the entire pulp per slice, detected by Western blot analysis, did not differ significantly among groups. However, evaluation of the immunohistochemical data from the five discrete subregions of the pulp, showed significant effect of treatment on TGFβ2 levels in the application area. Post-hoc group comparisons showed that TGFβ2 levels in this area were significantly reduced all experimental groups.

#### *Conclusions:*

This study has provided some evidence about the impact of three different resin adhesives and calcium hydroxide on the human pulp and the early cellular responses to these agents, by using a model closer to the *in vivo* condition. Pulp responses varied in an area- and material-specific way. The area of application was affected in all experimental groups, as indicated by the loss of tissue vitality and architecture, by the increased apoptosis, and by the reduction of Vimentin, TGFβ2 and ERdj5 levels – although to a different degree. Prime & Bond / phosphoric acid had the most damaging effect, followed by Clearfil SE, Clearfil S3 and Dycal in descending order. These results highlight the complexity of pulp responses to different capping materials. Further research is needed to clarify the mechanisms of pulp cytotoxicity and repair ability not only upon the application of adhesive systems but also upon the application of calcium hydroxide as well.

Key words: pulp; direct capping; adhesive systems; Dycal, apoptosis; Vimentin

## Βιβλιογραφία

1. Abou Neel EA, Chrzanowski W, Salih VM, Kim HW, Knowles JC. Tissue engineering in dentistry. *J Dent* 2014;42:915-28 Review.
2. About I, Camps J, Mitsiadis TA, Bottero MJ, Butler W, Franquin JC. Influence of resinous monomers on the differentiation in vitro of human pulp cells into odontoblasts. *J Biomed Mater Res* 2002;63:418-23.
3. Accorinte Mde L, Loguercio AD, Reis A, Muench A, de Araújo VC. Adverse effects of human pulps after direct pulp capping with different components from a total-etch, tree-step adhesive system. *Dent Mater* 2005;21:599-607.(α)
4. Accorinte Mde L, Loguercio AD, Reis A, Muench A, de Araújo VC. Response of human pulp capped with a bonding agent after bleeding control with hemostatic agents. *Oper Dent* 2005;30:147-155.(β)
5. Ahn YH, Kim TH, Choi H, Bae CH, Yang YM, Baek JA, Lee JC, Cho ES. Disruption of TGFβR 2 in odontoblasts leads to aberrant pulp calcification. *J Dent Res* 2015;94:828-35.
6. Akimoto N, Momoi Y, Kohno A, Suzuki S, Otsuki M, Suzuki S, Cox CF. Biocompatibility of Clearfil Liner Bond 2 and Clearfil AP-X system on non-exposed and exposed primate teeth. *Quintessence Int* 1998;29:177-88.
7. Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, Lopez-Cazaux S, Lieubeau B, Daculsi G, Guicheux J. Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. *Cell Tissue Res* 2005;321:391-400.
8. Anelli T & Sitia R. Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO J* 2008;27:315-27.
9. Annis MG, Zamzami N, Zhu W, Penn LZ, Kroemer G, Leber B, Andrews DW. Endoplasmic reticulum localized Bcl-2 prevents apoptosis when redistribution of cytochrome c is a late event. *Oncogene* 2001;20:1939-52.
10. Barzilai A & Yamamoto K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)* 2004; 3:1109-15.

11. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Robey PG, Shi S. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res* 2003;82:976-81.
12. Bègue-Kirn C, Smith AJ, Lorient M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H. Comparative analysis of TGF beta s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1994;38:405-20.
13. Bergenholtz G, Axelsson S, Davidson T, Frisk F, Hakeberg M, Kvist T, Norlund A, Petersson A, Portenier I, Sandberg H, Tranæus S, Mejare I. Treatment of pulps in teeth affected by deep caries - A systematic review of the literature. *Singapore Dent J* 2013;34:1-12.
14. Besaratinia A & Pfeifer GP. DNA adduction and mutagenic properties of acrylamide. *Mutat Res* 2005;580:31-40.
15. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism* 2000;49:3-8.
16. Bleicher F, Couble ML, Farges JC, Couble P, Magloire H. Sequential expression of matrix protein genes in developing rat teeth. *Matrix Biol* 1999;18:133-43.
17. Boonstra J & Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 2004;337:1-13.
18. Boyer MJ & Tannock IF. Regulation of intracellular pH in tumor cell lines: influence of microenvironmental conditions. *Cancer Res* 1992;52:4441-7.
19. Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 2002;415:92-6.
20. Cann KL & Hicks GG. Regulation of the cellular DNA double-strand break response. *Biochem Cell Biol* 2007;85:663-74.
21. Cassidy N, Fahey M, Prime SS, Smith AJ. Comparative analysis of transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. *Arch Oral Biol* 1997;42:219-23.
22. Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J* 2005;38:505-9.

23. Chang MC, Chen LI, Chan CP, Lee JJ, Wang TM, Yang TT, Lin PS, Lin HJ, Chang HH, Jeng JH. The role of reactive oxygen species and hemoxygenase-1 expression in the cytotoxicity, cell cycle alteration and apoptosis of dental pulp cells induced by BisGMA. *Biomaterials* 2010;31:8164-71.
24. Cheifetz S, Bassols A, Stanley K, Ohta M, Greenberger J, Massagué J. Heterodimeric transforming growth factor beta. Biological properties and interaction with three types of cell surface receptors. *J Biol Chem* 1988;263:10783-9.
25. Cheifetz S, Weatherbee JA, Tsang ML, Anderson JK, Mole JE, Lucas R, Massagué J. The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell* 1987;48:409-15.
26. Chen RS, Liu CC, Tseng WY, Jeng JH, Lin CP. Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells. *J Dent* 2003;31:223-9.
27. Chen YG, Liu F, Massague J. et al. Mechanism of TGF-beta receptor inhibition by FKBP12. *Embo J* 1997;16:3866-76.
28. Costa AS, Mesas AN, Hebling J. Pulp response to direct capping with an adhesive system. *Am JDent* 2000;13:81-7.
29. Costa CA, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalised odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mater* 1999;15:434-41.
30. Cox CF, Sübay RK, Ostro E, Suzuki S, Suzuki SH. Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. *Oper Dent* 1996;21:4-11.
31. Cunnea PM, Miranda-Vizueté A, Bertoli G, Simmen T, Damdimopoulos AE, Hermann S, Leinonen S, Huikko MP, Gustafsson JA, Sitia R, Spyrou G. ERdj5, an endoplasmic reticulum (ER)-resident protein containing DnaJ and thioredoxin domains, is expressed in secretory cells or following ER stress. *J Biol Chem* 2003;278:1059-66.
32. da Rosa WLO, Cocco AR, Silva TMD, Mesquita LC, Galarça AD, Silva AFD, Piva E. Current trends and future perspectives of dental pulp capping materials: A systematic review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2017 May 31. [Epub ahead of print].
33. da Silva LA, de Freitas AC, de Carvalho FK, de Queiroz AM, Nelson-Filho P, Porto-Neto ST. Direct pulp capping with a self-etching adhesive system: histopathologic

- evaluation in dogs' teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108(1):e34-40.
34. de Freitas JF. Characterization and aqueous extraction of calcium hydroxide materials. *Aust Dent J* 1982;27:352-6.
  35. de Souza Costa CA, Hebling J, Hanks CT. Effects of light-curing time on the cytotoxicity of a restorative resin composite applied to an immortalized odontoblast-cell line. *Oper Dent* 2003;28:365-70.
  36. Demarco FF, Tarquinio SB, Jaeger MM, de Araújo VC, Matson E. Pulp response and cytotoxicity evaluation of two dentin bonding agents. *Quintessence Int* 2001; 32:211-20.
  37. Demirci M, Hiller KA, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. *Dent Mater* 2008;24:362-71.
  38. Diamanti E, Mathieu S, Jeanneau C, Kittraki E, Panopoulos P, Spyrou G, About I. Endoplasmic reticulum stress and mineralization inhibition mechanism by the resinous monomer HEMA. *Int Endod J* 2013;46:160-8.
  39. Dobie K, Smith G, Sloan AJ, Smith AJ. Effects of alginate hydrogels and TGF-beta 1 on human dental pulp repair in vitro. *Connect Tissue Res* 2002;43:387-90.
  40. Downward J. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol* 2004;15:177-82.
  41. Durner J, Wellner P, Hickel R, Reichl FX. Synergistic interaction caused to human gingival fibroblasts from dental monomers. *Dent Mater* 2012;28:818-23.
  42. Eckes B, Dogic D, Colucci-Guyon E, et al. Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J Cell Sci* 1998;111:1897-907.
  43. Elias ST, Santos AF, Garcia FC, Pereira PN, Hilgert LA, Fonseca-Bazzo YM, Guerra EN, Ribeiro AP. Cytotoxicity of universal, self-etching and etch-and-rinse adhesive systems according to the polymerization time. *Braz Dent J* 2015;26:160-8.
  44. Engelmann J, Leyhausen G, Leibfritz D, Geurtsen W. Effect of TEGDMA on the intracellular glutathione concentration of human gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 2002;63:746-51.

45. Ersin NK & Eronat N. The comparison of a dentin adhesive with calcium hydroxide as a pulp-capping agent on the exposed pulps of human and sheep teeth. *Quintessence Int* 2005;65:271-80.
46. Fernandes AM, Silva GA, Lopes N JR, Napimoga MH, Benatti BB, Alves JB. Direct capping of human pulps with a dentin bonding system and calcium hydroxide: an immunohistochemical analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:385-90.
47. Ferracane JL & Condon JR. Rate of elution of leachable components from composite. *Dent Mater* 1990;6:282-7.
48. Filippin L, Magalhães PJ, Di Benedetto G, Colella M, Pozzan T. Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria. *J Biol Chem* 2003;278:39224-34.
49. Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ. Quantitation of growth factors IGF-I, IGF-II, and TGF-beta in human dentin. *J Bone Miner Res* 1990;5:717-23.
50. Fitzgerald M, Chiego DJ Jr, Heys DR. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol* 1990;35:707-15.
51. Freud M & Munksgaard EC. Enzymatic degradation of Bis-GMA/TEGDMA polymers causing decreased microhardness and greater wear in vitro. *Scand J Dent Res* 1990;98:351-5.
52. Fukae M, Kaneko I, Tanabe T, Shimizu M. Metalloproteinases in the mineralized compartments of porcine dentine as detected by substrate-gel electrophoresis. *Arch Oral Biol* 1991;36:567-73.
53. Gallorini M, Cataldi A, Di Giacomo V. HEMA-induced cytotoxicity: oxidative stress, genotoxicity and apoptosis. *Int Endod J* 2014;47:813-8.
54. Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res* 1998;41:474-80.
55. Glass RL & Zander HA. Pulp healing. *J Dent Res* 1949;28:97-107.



56. Goldberg M & Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:13-27.
57. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012;3:711-35.
58. Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith AJ. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials* 2006;27:2865-73.
59. Greenwald J, Fischer WH, Vale WW, Choe S. Three-finger toxin fold for the extracellular ligand-binding domain of the type II activin receptor serine kinase. *Nat Struct Biol* 1999;6:18-22.
60. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13625-30.
61. Gwinnett AJ & Tay FR. Early and intermediate time response of the dental pulp to an acid etch technique in vivo. *AM J Dent* 1997;10:S35-44.
62. Häcki J, Egger L, Monney L, Conus S, Rossé T, Fellay I, Borner C. Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene* 2000;19:2286-95.
63. Hagiwara M, Maegawa K, Suzuki M, Ushioda R, Araki K, Matsumoto Y, Hoseki J, Nagata K, Inaba K. Structural basis of an ERAD pathway mediated by the ER-resident protein disulfide reductase ERdj5. *Mol Cell* 2011;41:432-44.
64. Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res* 1991;70:1450-5.
65. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 2000;5:897-904.
66. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 2003;11:619-33.

67. Hashieh IA, Cosset A, Franquin JC, Camps J. In vitro cytotoxicity of one-step dentin bonding systems. *J Endod* 1999;25:89-92.
68. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:51-88.
69. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 1999;10:3787-99.
70. Heikinheimo K, Happonen RP, Miettinen PJ, Ritvos O. Transforming growth factor beta 2 in epithelial differentiation of developing teeth and odontogenic tumors. *J Clin Invest* 1993;91:1019-27.
71. Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, Leyhausen G, Geurtsen W. Genotoxicity of dental materials. *Mutat Res* 1996;368:181-94.
72. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997;390:465-71.
73. Hendrix MJ, Seftor EA, Chu YW, Trevor KT, Seftor RE. Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1996;15:507-25.
74. Herpin A, Lelong C, Favrel P. Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev Comp Immunol* 2004;28:461-85.
75. Hillmann G & Geurtsen W. Light-microscopical investigation of the distribution of extracellular matrix molecules and calcifications in human dental pulps of various ages. *Cell Tissue Res* 1997;289:145-54.
76. Hörsted-Bindslev P, Vilkinis V, Sidlauskas A. Direct capping of human pulps with a dentin bonding system or with calcium hydroxide cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Endod* 2003;96:591-600.
77. Hosoda A, Kimata Y, Tsuru A, Kohno K. JPDI, a novel endoplasmic reticulum-resident protein containing both a BiP-interacting J-domain and thioredoxin-like motifs. *J Biol Chem* 2003;278:2669-76.
78. Hu CC, Zhang C, Qian Q, Tatum NB. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod* 1998;24:744-51.

79. Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ, Exton JH. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptorpath way through IRE1alpha-mediated NF-kappa B activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol* 2006;26:3071-84.
80. Hwang YC, Hwang IN, Oh WM, Park JC, Lee DS, Son HH. Influence of TGF-beta1 on the expression of BSP, DSP, TGF-beta1 receptor I and Smad proteins during reparative dentinogenesis. *J Mol Histol* 2008;39:153-60.
81. Hyytiäinen M, Penttinen C, Keski-Oja J. Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004;41:233-64. Review.
82. Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE. Novel functions of Vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res* 2007;313:2050-62.
83. Jakowlew SB, Dillard PJ, Kondaiah P, Sporn MB, Roberts AB. Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a novel transforming growth factor-beta messenger ribonucleic acid from chick embryo chondrocytes. *Mol Endocrinol* 1988;2:747-55.
84. Janke V, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Leyhausen G, Geurtsen W. TEGDMA causes apoptosis in primary human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2003;82:814-8.
85. Jontell M, Hanks CT, Bratel J, Bergenholtz G. Effects o unpolymerized resin components on the function of accessory cells derived from the rat incisor pulp. *J Dent Res* 1995;74:1162-7.
86. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 2002;110:1389-98.
87. Kaufman RJ. Regulation of mRNA translation by protein folding in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* 2004;29:152-8.
88. Kawasaki KS, Tanaka S, Ishikawa T. On the incremental lines in human dentine as revealed by tetracycline labelling. *J Anat* 1977;123:427-36.
89. Kawashima S, Shinkai K, Suzuki M. Effect of an experimental adhesive resin containing multi-ion releasing fillers on directpulp-capping. *Dent Mater J* 2016;35:479-89.

90. Kim EC, Park H, Lee SI, Kim SY. Effect of the acidic dental resin monomer 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate on odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2015;117:340-9.
91. Kitasako Y, Inokoshi S, Tagami J. Effects of direct resin capping techniques on short-term response of mechanically exposed pulps. *J Dent* 1999;27:257-63.
92. Kitasako Y, Murray PE, Tagami J, Smith AJ. Histomorphometric analysis of dentinal bridge formation and pulpal inflammation. *Quintessence Int* 2002;33: 600-8.
93. Kitasako Y, Shibata S, Pereira PN, Tagami J. Short-term dentin bridging of mechanically-exposed pulps capped with adhesive resin systems. *Oper Dent* 2000;25:155-62.
94. Kleinsasser NH, Schmid K, Sassen AW, Harréus UA, Staudenmaier R, Folwaczny M, Glas J, Reichl FX. Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay. *Biomaterials* 2006;27:1762-70.
95. Koliniotou E & Tziafas D. Pulpal responses following direct pulp capping of healthy dog teeth with dentine adhesive systems. *J Dent* 2005;33:639-47.
96. Komabayashi T, Zhu Q, Eberhart R, Imai Y. Current status of direct pulp-capping materials for permanent teeth. *Dent Mater J* 2016;35:1-12.
97. Korsuwannawong S, Srichan R, Vajrabhaya LO. Cytotoxicity evaluation of self-etching dentine bonding agents in a cell culture perfusion condition. *European J Dent* 2012;6:408-14.
98. Kraus D, Wolfgarten M, Enkling N, Helfgen EH, Frentzen M, Probstmeier R, Winter J, Stark H. In-vitro cytocompatibility of dental resin monomers on osteoblast-like cells. *J Dent* 2017;65:76-82.
99. Krifka S, Spagnuolo G, Schmalz G, Schweikl H. A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials* 2013;34:4555-63.
100. Lagadic-Gossmann D, Huc L, Lecqueur V. Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. *Cell Death Differ* 2004;11:953-61.

101. Lang SH, Hyde C, Reid IN, et al. Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma. *Prostate* 2002;52:253-63.
102. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF- $\beta$ 1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J* 2012;45:439-48.
103. Lechner JH & Kalnitsky G. The presence of large amounts of type III collagen in bovine dental pulp and its significance with regard to the mechanism of dentinogenesis. *Arch Oral Biol* 1981;26:265-73.
104. Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 2003;23:7448-59.
105. Lee BS, Jan YD, Huang GS, Huang CH, Chou HY, Wang JS, Tseng WY. Effect of dentin bonding agent diffusing through dentin slices on the reactive oxygen species production and apoptosis of pulpal cells. *J Formos Med Assoc* 2015;114:339-46.
106. Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, Yoshida H, Mori K, Kaufman RJ. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev* 2002;16:452-66.
107. Lee Y, An SY, Park YJ, Yu FH, Park JC, Seo DG. Cytotoxic effects of one-step self-etching adhesives on an odontoblast cell line. *Scanning* 2016;38:36-42.
108. Lefevre M, Amjaad W, Goldberg M, Stanislawski L. TEGDMA induces mitochondrial damage and oxidative stress in human gingival fibroblasts. *Biomaterials* 2005;26:5130-7.
109. Lefevre M, Bourd K, Lorient MA, Goldberg M, Beaune P, Périanin A, Stanislawski L. TEGDMA modulates glutathione transferase P1 activity in gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2004;83:914-9.
110. Lesot H, Karcher-Djuricic V, Kubler MD, Ruch JV. Membrane-cytoskeleton interactions: inhibition of odontoblast differentiation by a monoclonal antibody directed against a membrane protein. *Differentiation* 1988;37:62-72.

111. Lesot H, Karcher-Djuricic V, Mark M, Meyer JM, Ruch JV. Dental cell interaction with extracellular-matrix constituents: type-I collagen and fibronectin. *Differentiation* 1985;29:176-81.
112. Lesot H, Lisi S, Peterkova R, Peterka M, Mitolo V, Ruch JV. Epigenetic signals during odontoblast differentiation. *Adv Dent Res* 2001;15:8-13. Review
113. Letterio JJ & Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 1998;16:137-61.
114. Levonen AL, Landar A, Ramachandran A, Ceaser EK, Dickinson DA, Zanoni G, Morrow JD, Darley-Usmar VM. Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J* 2004;378:373-82.
115. Li F, Liu X, Zhao S, Wu H, Xu HH. Porous chitosan bilayer membrane containing TGF- $\beta$ 1 loaded microspheres for pulp capping and reparative dentin formation in a dog model. *Dent Mater* 2014;30:172-81.
116. Li YC, Kuan YH, Huang FM, Chang YC. The role of DNA damage and caspase activation in cytotoxicity and genotoxicity of macrophages induced by bisphenol-A-glycidyl dimethacrylate. *Int Endod J* 2012;45:499-507.
117. Liebenberg WH. Intentional pulp capping: a clinical perspective of the adhesive experience. *J Adhes Dent* 1999;1:345-63.
118. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:679-728.
119. Linde A. Dentin mineralization and the role of odontoblasts in calcium transport. *Connect Tissue Res* 1995;33:163-70. Review.
120. Lo RS, Wotton D, Massagué J. Epidermal growth factor signaling via Ras controls the Smad transcriptional co-repressor TGIF. *EMBO J* 2001;20:128-36.
121. Lombardi T, Di Felice R, Muhlhauser J. Analysis of pH variation of various calcium hydroxide compounds in vitro. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol* 1991;34:73-8.
122. Lu Y, Liu T, Li H, Pi G. Histological evaluation of direct pulp capping with a self-etching adhesive and calcium hydroxide on human pulp tissue. *Int Endod J* 2008;41:643-50.

123. Lu Yu, Liu T, Li X, Li H, Pi G. Histologic evaluation of direct pulp capping with a self-etching adhesive and calcium hydroxide in beagles. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Endod* 2006;102:78-84.
124. Lucchini M, Romeas A, Couble ML, Bleicher F, Magloire H, Farges JC. TGF beta 1 signaling and stimulation of osteoadherin in human odontoblasts in vitro. *Connect Tissue Res* 2002;43:345-53.
125. Lukinmaa PL & Waltimo J. Immunohistochemical localization of types I, V, and VI collagen in human permanent teeth and periodontal ligament. *J Dent Res* 1992;71:391-7.
126. Lukinmaa PL, Mackie EJ, Thesleff I. Immunohistochemical localization of the matrix glycoproteins--tenascin and the ED-sequence-containing form of cellular fibronectin--in human permanent teeth and periodontal ligament. *J Dent Res* 1991;70:19-26.
127. Lutz M & Knaus P. Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal* 2002;14:977-88.
128. Ma Y, Hendershot LM. Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2003;278:34864-73.
129. Magloire H, Joffre A, Grimaud JA, Herbage D, Couble ML, Chavrier C. et al. Distribution of type III collagen in the pulp parenchyma of the human tooth: light and electron microscope immunotyping. *Histochemistry* 1982;74:319-28.
130. Malhotra JD & Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal* 2007;9:2277-93. Review.
131. Malhotra JD & Kaufman RJ. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol* 2007;18:716-31.
132. Malhotra JD, Miao H, Zhang K, Wolfson A, Pennathur S, Pipe SW, Kaufman RJ. Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:18525-30.
133. Mantellini MG, Botero TM, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nör JE. Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. *J Dent Res* 2003;82: 592-6.

134. Marciniak SJ & Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev* 2006;86:1133-49.
135. Marques MS, Wesselink PR, Shemesh H. Outcome of Direct Pulp Capping with Mineral Trioxide Aggregate: A Prospective Study *J Endod* 2015;41:1026-31.
136. Massagué J & Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 2000;14:627-44.
137. Massagué J. TGF- $\beta$  signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;67:753-91.
138. Mathers J, Fraser JA, McMahon M, Saunders RD, Hayes JD, McLellan LI. Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress. *Biochem Soc Symp* 2004;:157-76.
139. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 2001;21:1249-59.
140. Medina VO 3rd, Shinkai K, Shirono M, Tanaka N, Katoh Y. Histopathologic study on pulp response to single-bottle and self-etching adhesive systems. *Oper Dent* 2002;27:330-42.
141. Melin M, Joffre-Romeas A, Farges JC, Couble ML, Magloire H, Bleicher F. Effects of TGFbeta1 on dental pulp cells in cultured human tooth slices. *J Dent Res* 2000;79:1689-96.
142. Mina M & Braut A. New insight into progenitor/stem cells in dental pulp using Col1a1-GFP transgenes. *Cells Tissues Organs* 2004;176:120-33.
143. Minin AA & Moldaver MV. Intermediate Vimentin filaments and their role in intracellular organelle distribution. *Biochem (Mosc)* 2008;73:1453-66.
144. Modena KC, Casas-Apayco LC, Atta MT, Costa CA, Hebling J, Sipert CR, Navarro MF, Santos CF. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. *J Appl Oral Sci* 2009;17:544-54.
145. Molinari M. N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal. *Nat Chem Biol* 2007;3:313-20.
146. Morisbak E, Ansteinsson V, Samuelsen JT. Cell toxicity of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA): the role of oxidative stress. *Eur J Oral Sci* 2015;123:282-7.
147. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 2002;277:34287-94.



148. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, Hoffmann KH. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* 2005;24:155-65.
149. Murakami M, Imabayashi K, Watanabe A, Takeuchi N, Ishizaka R, Iohara K, Yamamoto T, Nakamura H, Nakashima M. Identification of novel function of Vimentin for quality standard for regenerated pulp tissue. *J Endod* 2012;38:920-6.
150. Murray PE, Hafez AA, Smith AJ, Cox CF. Bacterial microleakage and pulp inflammation associated with various restorative materials. *Dent Mater* 2002;18:470-8.
151. Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 2000;150:887-94.
152. Nakashima M. Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. *Arch Oral Biol* 1994;39:1085-9.
153. Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* 2002;16:1345-55.
154. Noda M, Wataha JC, Lewis JB, Kaga M, Lockwood PE, Messer RL, Sano H. Dental adhesive compounds alter glutathione levels but not glutathione redox balance in human THP-1 monocytic cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;73:308-14.
155. Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* 2001;153:1011-22.
156. Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Jungreis R, Harding HP, Ron D. Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J* 2003;22:1180-7.
157. Nowicka A, Łagocka R, Lipski M, Parafiniuk M, Grocholewicz K, Sobolewska E, Witek A, Buczkowska-Radlińska J. Clinical and histological evaluation of direct pulp capping on human pulp tissue using a dentin adhesive system. *Biomed Res Int* 2016;2591273 Epub 2016 Oct 10.

158. Oka S, Oka K, Xu X, Sasaki T, Bringas P Jr, Chai Y. Cell autonomous requirement for TGF-beta signaling during odontoblast differentiation and dentin matrix formation. *Mech Dev* 2007;124:409-15.
159. Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J* 2002;366:585-94.
160. Olmez A, Oztaş N, Başak F, Sabuncuoğlu B. A histologic study of direct pulp-capping with adhesive resins. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Endod* 1998;86:98-103.
161. Pagoria D, Lee A, Geurtsen W. The effect of camphorquinone (CQ) and CQ-related photosensitizers on the generation of reactive oxygen species and the production of oxidative DNA damage. *Biomaterials* 2005;26:4091-9.
162. Pamejer CH & Stanley HR. The disastrous effects of the "total etch" technique in vital pulp capping in primates. *Am J Dent* 1998;11:S45-54.
163. Paranjpe A, Bordador LC, Wang MY, Hume WR, Jewett A. Resin monomer 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) is a potent inducer of apoptotic cell death in human and mouse cells. *J Dent Res* 2005;84:172-7.
164. Parisay I, Ghodduji J, Forghani M. A review on vital pulp therapy in primary teeth. *Iran Endod J* 2015;10:6-15.
165. Park HJ, Makepeace CM, Lyons JC, Song CW. Effect of intracellular acidity and ionomycin on apoptosis in HL-60 cells. *Eur J Cancer* 1996;32:540-6.
166. Parthasarathy A, Kamat SB, Kamat M, Kidiyoor KH. Histological response of human pulps capped with calcium hydroxide and a self-etch adhesive containing an antibacterial component. *J Conserv Dent* 2016;19:274-9.
167. Paul SJ, Leach M, Rueggeberg FA, Pashley DH. Effect of water content on the physical properties of model dentine primer and bonding resins. *J Dent* 1999;27:209-14.
168. Pawlowska E, Poplawski T, Ksiazek D, Szczepanska J, Blasiak J. Genotoxicity and cytotoxicity of 2-hydroxyethyl methacrylate. *Mutat Res* 2010;696:122-9.

169. Pelton RW, Dickinson ME, Moses HL, Hogan BL. In situ hybridization analysis of TGF beta 3 RNA expression during mouse development: comparative studies with TGF beta 1 and beta 2. *Development* 1990;110:609-20.
170. Pepin MC, Beauchemin M, Plamondon J, O'Connor-McCourt MD. Scanning-deletion analysis of the extracellular domain of the TGF-beta receptor type II. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;220:289-93.
171. Pereira JC, Brante CM, Berbert A, Mondelli J. Effect of calcium hydroxide in powder or in paste form on pulp-capping procedures: histopathologic and radiographic analysis in dog's pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980;50:176-86.
172. Pereira JC, Segala AD, Costa CA. Human pulpal response to direct pulp capping with an adhesive system. *Am J Dent* 2000;13:139-47.
173. Pereira SA, de Menezes FC, Rocha-Rodrigues DB, Alves JB. Pulp reactions in human teeth capped with self-etching or total-etching adhesive systems. *Quintessence Int* 2009;40:491-6.
174. Phua DC, Humbert PO, Hunziker W. Vimentin regulates scribble activity by protecting it from proteasomal degradation. *Mol Biol Cell* 2009;20:2841-55.
175. Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J* 1999;13:2105-24. Review.
176. Porto IC, Oliveira DC, Raele RA, Ribas KH, Montes MA, De Castro CM. Cytotoxicity of current adhesive systems: in vitro testing on cell cultures of primary murine macrophages. *Dent Mater* 2011;27:221-8.
177. Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del Rio G, Bredesen DE, Ellerby HM. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* 2002;277:21836-42.
178. Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res* 1995;74:1602-6.
179. Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. *Dent Mater* 2008;24:149-64.
180. Ron D & Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Native Reviews. Mol Cell Biol* 2007;8:519-29.

181. Ron D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest* 2002;110:1383-8.
182. Ruch JV, Lesot H, Bègue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1995;39:51-68.
183. Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 2004;14:20-8.
184. Saghiri MA, Asatourian A, Garcia-Godoy F, Sheibani N. Effect of biomaterials on angiogenesis during vital pulp therapy. *Dent Mater J* 2016;35:701-709.
185. Saito M, Sakagami H, Fujisawa S. Cytotoxicity and apoptosis induction by butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). *Anticancer Res* 2003;23:4693-701.
186. Samuelsen JT, Dahl JE, Karlsson S, Morisbak E, Becher R. Apoptosis induced by the monomers HEMA and TEGDMA involves formation of ROS and differential activation of the MAP-kinases p38, JNK and ERK. *Dent Mater* 2007;23:34-9.
187. Scarano A, Manzon L, Di Giorgio R, Orsini G, Tripodi D, Piattelli A. Direct capping with four different materials in humans: histological analysis of odontoblasts activity. *J Endod* 2003;29:729-34.
188. Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, Saunders T, Bonner-Weir S, Kaufman RJ. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell* 2001;7:1165-76.
189. Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol* 2000;45: 355-361.
190. Schuurs AH, Gruythuysen RJ, Wesselink PR. Pulp capping with adhesive resin-based composite vs. calcium hydroxide: a review. *Endod Dent Traumatol* 2000;16:240-50.
191. Schweikl H, Altmannberger I, Hanser N, Hiller KA, Bolay C, Brockhoff G, Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G. The effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cell cycle of mammalian cells. *Biomaterials* 2005;26:4111-8.(b)

192. Schweikl H, Hiller KA, Bolay C, Kreissl M, Kreismann W, Nusser A, Steinhauser S, Wieczorek J, Vasold R, Schmalz G. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomaterials* 2005;26:1713-9.
193. Schweikl H, Schmalz G, Rackebrandt K. The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella typhimurium* and V79 cells. *Mutat Res* 1998;415:119-30.
194. Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res* 2001;80:1615-20.
195. Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res* 2001;80:1615-20.
196. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res* 2006;85:870-7.
197. Septier D, Hall RC, Lloyd D, Embery G, Goldberg M. Quantitative immunohistochemical evidence of a functional gradient of chondroitin 4-sulphate/dermatan sulphate, developmentally regulated in the pre-dentine of rat incisor. *Histochem J* 1998;30:275-84.
198. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1387-1404.
199. Shi S & Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 2003;18:696-704.
200. Shi Y & Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113:685-700. Review.
201. Shinkai K, Taira Y, Kawashima S, Suzuki S, Suzuki M. Histological evaluation of direct pulp capping with all-in-one adhesives in rat teeth. *Dent Mater J* 2017;36:348-56.
202. Sidrauski C & Walter P. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* 1997;90:1031-9.
203. Silva GA, Gava E, Lanza LD, Estrela C, Alves JB. Subclinical failures of direct pulp capping of human teeth by using a dentin bonding system. *J Endod* 2013;3:182-9.
204. Singh S, Sadacharan S, Su S, Belldegrun A, Persad S, Singh G. Overexpression of vimentin: role in the invasive phenotype in an androgen-independent model of prostate cancer. *Cancer Res* 2003;63:2306-11.

205. Sloan AJ & Smith AJ. Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in vitro. *Arch Oral Biol* 1999;44:149-56.
206. Sloan AJ, Couble ML, Bleicher F, Magloire H, Smith AJ, Farges JC. Expression of TGF-beta receptors I and II in the human dental pulp by in situ hybridization. *Adv Dent Res* 2001;15:63-7.
207. Sloan AJ, Matthews JB, Smith AJ. et al. TGF-beta receptor expression in human odontoblasts and pulpal cells. *Histochem J* 1999;31:565-9.
208. Smith AJ, Murray PE, Sloan AJ, Matthews JB, Zhao S. Trans-dentinal stimulation of tertiary dentinogenesis. *Adv Dent Res* 2001;15:51-4.
209. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang CY, Wang S, Shi S. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One* 2006;1:e79.
210. Spagnuolo G, D'antò V, Cosentino C, Schmalz G, Schweikl H, Rengo S. Effect of N-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. *Biomaterials* 2006;27:1803-9.
211. Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G, Cosentino C, Rengo S, Schweikl H. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase amplifies TEGDMA-induced apoptosis in primary human pulp cells. *J Dent Res* 2004;83:703-7.(b)
212. Spencer P & Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res* 2002;62:447-56.
213. Stanislawski L, Lefeuvre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Périanin A. TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res A* 2003;66:476-82.
214. Stanley HR & Pameijer CH. Dentistry's friend: calcium hydroxide. *Oper Dent* 1997;22:1-3.
215. Struillou X, Boutigny H, Soueidan A, Layrolle P. Experimental animal models in periodontology: a review. *Open Dent J* 2010;4:37-47
216. Subay RK & Demirsi M. Pulp tissue reactions to a dentin bonding agent as a direct pulp capping agent. *JOE* 2005;31:201-4.

217. Suzuki C, Murakami G, Fukuchi M, Shimanuki T, Shikauchi Y, Imamura T, Miyazono K. Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J Biol. Chem* 2002;277:39919–25.
218. Suzuki M, Taira Y, Kato C, Shinkai K, Katoh Y. Histological evaluation of direct pulp capping of rat pulp with experimentally developed low-viscosity adhesives containing reparative dentin-promoting agents. *J Dent* 2016;44:27-36.
219. Tan Y, Dourdin N, Wu C, De Veyra T, Elce JS, Greer PA. Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2006;281:16016-24.
220. Tannock IF & Rotin D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res* 1989;49:4373-84.
221. Thomas CG & Spyrou G. ERdj5 sensitizes neuroblastoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2009;284:6282-90.
222. Thyagarajan T, Sreenath T, Cho A, Wright JT, Kulkarni AB. Reduced expression of dentin sialophosphoprotein is associated with dysplastic dentin in mice overexpressing transforming growth factor-beta 1 in teeth. *J Biol Chem* 2001;276:11016-20.
223. Tobiume K, Saitoh M, Ichijo H. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer. *J Cell Physiol* 2002;191:95-104.
224. Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal feeling with calcium hydroxide. *J Endod* 1981;7:17-21.
225. Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL. SARA, a FYVE Domain Protein that Recruits Smad2 to the TGF- $\beta$  Receptor. *Cell* 1998;95:779–91.
226. Tuncer S, Demirci M, Schweikl H, Erguven M, Bilir A, Kara Tuncer A. Inhibition of cell survival, viability and proliferation by dentin adhesives after direct and indirect exposure in vitro. *Clin Oral Investig* 2012;16:1635-46.
227. Tziafas D, Alvanou A, Panagiotakopoulos N, Smith AJ, Lesot H, Komnenou A, Ruch JV. Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after in vivo implantation of dentine matrix components. *Arch Oral Biol* 1995;40:883-93.

228. Tziafas D, Alvanou A, Papadimitriou S, Gasic J, Komnenou A. Effects of recombinant basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-II and transforming growth factor-beta 1 on dog dental pulp cells in vivo. *Arch Oral Biol* 1998;43:431–44.
229. Ushioda R & Nagata K. The endoplasmic reticulum-associated degradation and disulfide reductase ERdj5. *Methods Enzymol* 2011;490:235-58.
230. Ushioda R, Nagata K. The endoplasmic reticulum-associated degradation and disulfide reductase ERdj5. *Methods Enzymol* 2011;490:235-58.
231. Ushiyama J. Gap junctions between odontoblasts revealed by transjunctional flux of fluorescent tracers. *Cell Tissue Res* 1989;258:611-6.
232. Vajrabhaya LO, Pasasuk A, Harnirattisai C. Cytotoxicity evaluation of single component dentin bonding agents. *Oper Dent* 2003;28:440-4.
233. van Amerongen JP, Lemmens IG, Tonino GJ. Immunofluorescent localization and extractability of fibronectin in human dental pulp. *Arch Oral Biol* 1984;29:93-9.
234. van Huizen R, Martindale JL, Gorospe M, Holbrook NJ. P58IPK, a novel endoplasmic reticulum stress-inducible protein and potential negative regulator of eIF2alpha signaling. *J Biol Chem* 2003;278:15558-64.
235. van Landuyt KL, Nawrot T, Geebelen B, De Munck J, Snauwaert J, Yoshihara K, Scheers H, Godderis L, Hoet P, Van Meerbeek B. How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dent Mater* 2011;27:723-47.
236. Volk J, Engelmann J, Leyhausen G, Geurtsen W. Effects of three resin monomers on the cellular glutathione concentration of cultured human gingival fibroblasts. *Dent Mater* 2006;22:499-505.
237. Wang XF, Lin HY, Ng-Eaton E, Downward J, Lodish HF, Weinberg RA. Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor. *Cell* 1991;67:797-805.
238. Watson WH, Yang X, Choi YE, Jones DP, Kehrer JP. Thioredoxin and its role in toxicology. *Toxicol Sci* 2004;78:3-14.
239. Watts A, Paterson RC. Bacterial contamination as a factor influencing the toxicity of materials to the exposed dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987;64:466-74.



240. Wells RG, Yankelev H, Lin HY, Lodish HF. Biosynthesis of the type I and type II TGF-beta receptors. Implications for complex formation. *J Biol Chem* 1997;272:11444–51.
241. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 1994;370:341–7.
242. Wu G, Chen YG, Ozdamar B, Gyuricza CA, Chong PA, Wrana JL, Massagué J, Shi Y. Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science* 2000;287:92–7.
243. Wu JW, Krawitz AR, Chai J, Li W, Zhang F, Luo K, Shi Y. Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: insights on Ski-mediated repression of TGF-beta signaling. *Cell* 2002;111:357-67.
244. Yan W, Frank CL, Korth MJ, Sopher BL, Novoa I, Ron D, Katze MG. Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15920-5.
245. Yang X, Zhang S, Pang X, Fan M. Pro-inflammatory cytokines induce odontogenic differentiation of dental pulp-derived stem cells. *J Cell Biochem* 2012;113:669-77.
246. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 2000;6:1355-64.
247. Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* 2001;276:13935-40.
248. Yoshida N, Yoshida K, Iwaku M, Nakamura H, Ozawa H. A confocal laser scanning microscopic study of the immunofluorescent localization of fibronectin in the odontoblast layer of human teeth. *Arch Oral Biol* 1994;39:395-400.
249. Yoshida N, Yoshida K, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa H. Immunoelectron-microscopic study of the localization of fibronectin in the odontoblast layer of human teeth. *Arch Oral Biol* 1995;40:83-9.
250. Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev Cell* 2003;4:265-71.

251. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 2001;107:881-91.
252. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 2000;20:6755-67.
253. Yoshii E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res* 1997;37:517-24.
254. Yu J, Deng Z, Shi J, Zhai H, Nie X, Zhuang H, Li Y, Jin Y. Differentiation of dental pulp stem cells into regular-shaped dentin-pulp complex induced by tooth germ cell conditioned medium. *Tissue Eng* 2006;12:3097-105.
255. Zander HA. Reaction of dental pulp to calcium hydroxide. *J Dent Res* 1939;18:373-9.
256. Zhang W, Walboomers XF, Jansen JA. The formation of tertiary dentin after pulp capping with a calcium phosphate cement, loaded with PLGA microparticles containing TGF-beta1. *J Biomed Mater Res A* 2008;85:439-44.
257. Zhao S, Sloan AJ, Murray PE, Lumley PJ, Smith AJ. Ultrastructural localisation of TGF-beta exposure in dentine by chemical treatment. *Histochem J* 2000;32:489-94.
258. Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J, Thompson CB. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol* 2003;162:59-69.