

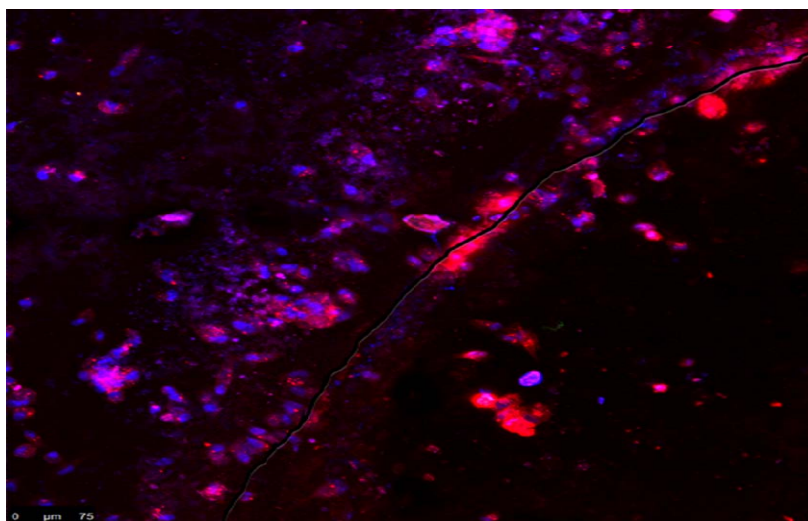
ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: ΕΝΔΟΔΟΝΤΙΑ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΡΙΖΙΚΟΥΣ
ΣΩΛΗΝΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΥΔΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ
Ή ΤΡΙΠΛΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ.**

ΓΟΥΓΟΥΣΗΣ Α. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2014

Περιεχόμενα

Πρόλογος

Εισαγωγή

Γενικό μέρος

1. Βασικές αρχές της Αναγεννητικής Ενδοδοντολογίας

A. Γενικά

B. Βλαστικά κύτταρα των οδοντικών ιστών

i. DPSCs – Dental pulp stem cells – Βλαστικά κύτταρα του οδοντικού πολφού

ii. SHED – Stem cells from exfoliated and deciduous teeth – Βλαστικά κύτταρα νεογιλών δοντιών

iii. PDLSCs – Periodontal ligament stem cells – Βλαστικά κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου

iv. DFSCs – Dental follicle stem cells – Βλαστικά κύτταρα του οδοντοθυλακίου

v. SCAP – Stem cells from the apical papilla – Βλαστικά κύτταρα της

ακρορριζικής θηλής

Γ. Ικριώματα

Δ. Αναπτυξιακοί παράγοντες

2. Η Αναγεννητική Ενδοδοντολογία στην κλινική πράξη

3. Φάρμακα στο χώρο της Αναγεννητικής Ενδοδοντολογίας

i) Αντιβιοτικά

ii) Υδροξείδιο του ασβεστίου

Ειδικό μέρος

Βιβλιογραφία

Πρόλογος

Ένα από τα όργανα που η φύση έχει προικίσει τον άνθρωπο προκειμένου να εξασφαλίσει την ομαλή λειτουργία του οργανισμού είναι ο πολφός. Ο πολφός είναι ένα πολυδύναμο όργανο με ευρεία λειτουργική αποστολή, που χαρακτηρίζεται από θρέψη, αίσθηση, άμυνα και πλάση.

Μελετώντας τη σύγχρονη βιβλιογραφία διαπιστώνεται ότι ολοένα και αυξάνεται ο αριθμός των ερευνών που αφορούν την Αναγεννητική Ενδοδοντολογία. Ένα κομμάτι αυτής της επιστήμης ασχολείται με την προσπάθεια αναγέννησης του πολφικού ιστού σε περιπτώσεις νέκρωσής του και η αποκατάσταση των λειτουργιών του. Παρόλο που περιγράφονται πολλά επιτυχημένα περιστατικά τέτοιας φιλοσοφίας και γίνεται προσπάθεια κατανόησης των μηχανισμών που λαμβάνουν μέρος δεν υπάρχει ομοιογένεια όσον αφορά τα πρωτόκολλα και τις μεθοδολογίες που ακολουθούνται. Με βάση το κενό αυτό αποφάσισα να διερευνήσω το ρόλο και την επίδραση των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην όλη διαδικασία.

Το κίνητρο, η κεντρική ιδέα, ο σχεδιασμός και ο ενθουσιασμός γι' αυτήν την προσπάθεια προέκυψαν από τη συνεργασία μου με τον επιβλέποντα μου Αναπληρωτή Καθηγητή Ενδοδοντίας κ. Ευάγγελο Κοντακιώτη. Τον ευχαριστώ θερμά όχι μόνο για τη βοήθειά του στο έργο αυτό, αλλά και για τα στοιχεία που με βοήθησε να καλλιεργήσω και να αναπτύξω κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Αυτά τα στοιχεία ήταν η υπομονή, η επιμονή, η υπευθυνότητα, η κριτική θεώρηση και αξιολόγηση, η διαρκής αναζήτηση του νέου και καινοτόμου, η συνεχής βελτίωση και εξέλιξη. Υπήρξε ένας πραγματικός μέντορας.

Από τη θέση αυτή θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του διδακτικού και ερευνητικού προσωπικού της Ενδοδοντίας με επικεφαλής τον Αναπληρωτή κ. Π. Πανόπουλου και κ. Μ. Χαμπάζ για την άριστη συνεργασία.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην Λέκτορα Ενδοδοντίας κ. Α. Αγραφιώτη για τις εύστοχες παρατηρήσεις της και στις Βιολόγους Ε. Αναστασιάδου και Β. Ταρασλιά για την υποστήριξη και βελτίωση του πρωτοκόλλου μου, αλλά και για τη διδασχή των μεθοδολογιών έρευνας σχετικά με την καλλιέργεια και την ανάπτυξη βλαστικών κυττάρων.

Θα ήταν μεγάλη παράλειψη, εάν δεν έλεγα ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους συναδέλφους μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα της Ενδοδοντίας, αλλά και

των λοιπών μεταπτυχιακών προγραμμάτων για την άψογη συνεργασία μας, τη φιλική και ευγενική συμπεριφορά τους σε όλα τα επίπεδα, καθ' όλη τη διάρκεια των χρόνων εκπαίδευσης μας. Τέλος, θέλω να εκφράσω τη βαθιά μου ευχαριστία στο συνάδελφο και φίλο Ι. Τσατσούλη για τη συνεχή και πολύτιμη συμπαράστασή του, στο συνάδελφο Χ. Φιλιππάτο και στο Στατιστικολόγο Γ. Μαργαρίτη για τη βοήθεια που μου προσέφεραν.

Αφιερώνεται στους γονείς μου...

Εισαγωγή

Σε κάθε τι νέο που προκύπτει στην Επιστήμη υπάρχει η τάση και διάθεση να ανιχνεύσουμε τις ρίζες του στο παρελθόν. Οι ρίζες της Αναγεννητικής Ιατρικής τοποθετούνται στη Μυθολογία.

Ο Προμηθέας Δεσμώτης είναι ο πρώτος στον οποίο παρατηρήθηκε αναγέννηση των ιστών. Ο τιμωρός του, ο θεός Δίας, τον αλυσόδεσε στα βράχια του Καυκάσου και ολημερίς ένα όρνεο κατέτρωγε τα σωθικά του. Το βράδυ όμως τα όργανα του Τιτάνα Προμηθέα αναγεννόνταν. Προς τούτοις η Αναγεννητική Ιατρική διάλεξε σαν σύμβολο της *παγκοσμίως τον Προμηθέα Δεσμώτη*¹ (Εικ.1).



Εικ. 1. Ο Προμηθέας Δεσμώτης

Η ανάπτυξη της Αναγεννητικής Ιατρικής υπόσχεται να αντικαταστήσει ιστούς του σώματος, οι οποίοι έχουν καταστραφεί για οποιονδήποτε λόγο, με νέους, που θα εξασφαλίζουν τη σωστή λειτουργία του οργανισμού². Η Ιστική Μηχανική και η Βιολογία των βλαστικών κυττάρων έχουν δώσει σημαντική ώθηση στην πρόοδο των αναγεννητικών τεχνικών³. Ο χώρος της Ενδοδοντολογίας έχει αρχίσει να εκμεταλλεύεται τις αρχές της Αναγεννητικής Ιατρικής και να εξελίσσει περαιτέρω την έρευνα και τη γνώση προκειμένου να επιτύχει την επιδιόρθωση ή και την αντικατάσταση κατεστραμμένων οδοντικών ιστών⁴.

Μέσα από τους διάφορους ορισμούς που έχουν δοθεί κατά καιρούς, θα μπορούσαμε να συνοψίσουμε ότι Αναγεννητική Ιατρική είναι η δημιουργία βιώσιμων και λειτουργικών ιστών με σκοπό την επιδιόρθωση, αντικατάσταση ή ενίσχυση οργάνων των οποίων οι λειτουργίες έχουν διαταραχθεί λόγω ηλικίας, ασθένειας, τραύματος ή γενετικής ανωμαλίας⁵.

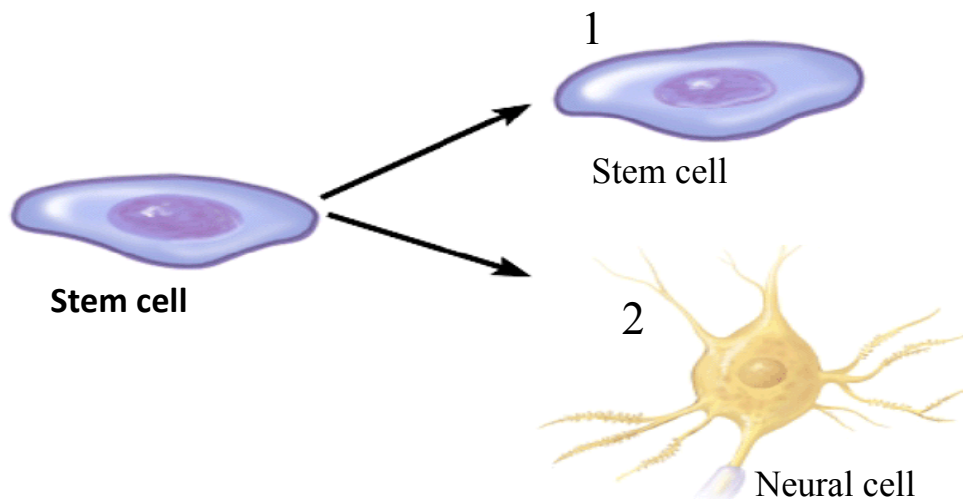
Για την επίτευξη των στόχων της Αναγεννητικής Ιατρικής απαιτούνται διάφορες επιμέρους ειδικότητες. Χημεία, Μοριακή Βιολογία, Γενετική, Νανοτεχνολογία, Ιστική Μηχανική και άλλοι επιστημονικοί κλάδοι συνεργάζονται για να οδηγήσουν τελικά στην αναγέννηση του πάσχοντος οργάνου⁶.

Η παρασκευή ιστών απαιτεί: 1) αρχικά κύτταρα, τα οποία με η διαίρεσή τους μπορούν να δώσουν έναν ικανό πληθυσμό, 2) ικριώματα πάνω στα οποία θα αναπτυχθούν οι καλλιέργειες κυττάρων και 3) αναπτυξιακοί παράγοντες, οι οποίοι θα διευκολύνουν και θα επιταχύνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό⁷.

1. Βασικές αρχές της Αναγεννητικής Ενδοδοντολογίας

A. Γενικά

Η Ενδοδοντολογία θεωρείται πρωτοπόρος διότι την πρώτη μορφή αναγέννησης ιστών την συναντούμε στην πράξη εδώ και χρόνια με την κάλυψη του πολφού⁸. Η ώθηση που έχει δεχτεί η Αναγεννητική Ιατρική τα τελευταία χρόνια οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην ανακάλυψη και εκμετάλλευση των βλαστικών κυττάρων. Τα βλαστικά κύτταρα είναι αρχέγονα αδιαφοροποίητα κύτταρα με δύο βασικές ιδιότητες: 1) διαθέτουν την ικανότητα να αυτοπολλαπλασιάζονται και 2) μπορούν να δώσουν θυγατρικά κύτταρα τα οποία οδηγούν τελικά σε διαφοροποιημένους πληθυσμούς (Εικ.2).



Εικ. 2. Σχηματική αναπαράσταση της πιθανή εξέλιξη βλαστικών κυττάρων.

Τα βλαστικά κύτταρα χωρίζονται σύμφωνα με την πηγή προέλευσής τους σε 1) εμβρυικά (embryonic stem cells) και σε 2) «μετά την γέννηση» ή ενηλίκων (postnatal/adult stem cells). Η διάκριση αυτή γίνεται εξ αιτίας της ικανότητας των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων να δίνουν μεγαλύτερο αριθμό ειδών διαφοροποιημένων κυττάρων. Τελευταία δεδομένα όμως παρουσιάζουν τα βλαστικά κύτταρα ενηλίκων να μπορούν να δίνουν σημαντικά μεγαλύτερη ποικιλία θυγατρικών κυττάρων από αυτήν που αρχικά είχε εκτιμηθεί.

Ανάλογα με τον αριθμό του είδους των διαφοροποιημένων κυττάρων που μπορούν να δώσουν τα βλαστικά κύτταρα – ιδιότητα που χαρακτηρίζεται ως πλαστικότητα- κατηγοριοποιούνται σε 1) ολοδύναμα - totipotent, 2) πολυδύναμα - pluripotent και 3) μερικώς πολυδύναμα - multipotent. Τα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα είναι αυτά τα οποία μπορούν τελικά να δώσουν έναν ολόκληρο οργανισμό. Είναι εμβρυικά κύτταρα και ανευρίσκονται σε έμβρυα 1-3 ημερών. Τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα αναπτυσσόμενα σε κατάλληλες συνθήκες μπορούν τελικά να δώσουν όλους τους τύπους κυττάρων που συναντάμε στον οργανισμό και είναι άνω των διακοσίων. Είναι και αυτά εμβρυικά κύτταρα και έχουν προέλευση την βλαστοκύστη εμβρύων 5-14 ημερών. Τα μερικώς πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα τέλος παρόλο που διαφοροποιούνται δίνουν περιορισμένο αριθμό ιστών. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν κύτταρα τα οποία μπορούν να ληφθούν από εμβρυικό ιστό, αίμα ομφαλίου λώρου, όπως και όλα τα

μετά την γέννηση βλαστικά κύτταρα^{9,10}.

Τα βλαστικά κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης είναι μη αιμοποιητικά, μερικώς πολυδύναμα κύτταρα, τα οποία μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών τύπων που περιλαμβάνει διαφόρους ιστούς. Χαρακτηρίστηκαν για πρώτη φορά πριν από περίπου πενήντα χρόνια από τον Friedenstein και την επιστημονική του ομάδα όταν αναγνώρισαν μια συγκεκριμένη ομάδα κυττάρων στο μυελό των οστών. Αυτά τα κύτταρα χαρακτηρίζονταν από μορφολογία παρόμοια με αυτή των ινοβλαστών, δυνατότητα προσκόλλησης σε πλαστικές επιφάνειες ανάπτυξης ιστών και οστεογενή ικανότητα. Επίσης εκφράζουν συγκεκριμένους πρωτεϊνικούς δείκτες, όπως CD90, CD73, CD105, CD44 και είναι αρνητικά για τις CD31, CD34 και CD45. Με την ιδιότητα των μερικώς πολυδύναμων κυττάρων έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν σε οστεοβλάστες, νευροβλάστες, χονδροβλάστες, μυοβλάστες, λιποκύτταρα, κ.ά. Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα ανευρίσκονται επίσης σε λιπώδη και μυϊκό ιστό, σε αρθρικό και αμνιακό υγρό, στον ομφάλιο λώρο και σε δόντια. Η ύπαρξή τους σε οδοντικούς ιστούς, οι ιδιότητές τους και η σχετικά εύκολη απομόνωσή τους καθιστά τα οδοντικά μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα ένα πεδίο εκτεταμένης μελέτης και ένα σημαντικό εργαλείο στην Ιστική Μηχανική και την Αναγεννητική Ιατρική¹¹.

B. Βλαστικά κύτταρα των οδοντικών ιστών

Οι κύριοι τύποι κυττάρων που συμμετέχουν στην ανάπτυξη των οδοντικών ιστών είναι οι αδαμαντινοβλάστες, επιθηλιακής προέλευσης, οι οποίοι σχηματίζουν την αδαμαντίνη, οι οδοντοβλάστες, μεσεγχυματικής προέλευσης, οι οποίοι σχηματίζουν την οδοντίνη και οι οστεϊνοβλάστες, μεσεγχυματικής προέλευσης, οι οποίοι σχηματίζουν την οστεΐνη. Τα βλαστικά κύτταρα με τη διαφοροποίησή τους σε κάθε μια από αυτές τις κατηγορίες οδηγούν εν τέλει στο σχηματισμό οδοντικών ιστών¹².

Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί πέντε είδη βλαστικών κυττάρων στους οδοντικούς ιστούς : 1) βλαστικά κύτταρα του οδοντικού πολφού (dental pulp stem cells - DPSCs), 2) βλαστικά κύτταρα νεογιλών δοντιών (stem cells from exfoliated and deciduous teeth - SHED), 3) βλαστικά κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου (periodontal ligament stem cells - PDLSCs), 4) βλαστικά κύτταρα του οδοντοθυλακίου (dental follicle stem cells – DFSCs, 5) βλαστικά κύτταρα της οδοντικής θηλής (stem cells from the apical papilla – SCAP). Εξ'αυτών όλα εκτός των SHED προέρχονται από την μόνιμη οδοντοφυΐα.

i. Βλαστικά κύτταρα του οδοντικού πολφού - Dental Pulp Stem Cells - DPSCs

Οι αναγεννητικές ιδιότητες του συμπλέγματος οδοντίνης - πολφού, οδήγησε την επιστημονική κοινότητα στην υπόθεση ότι ο οδοντικός πολφός πιθανό να εμπεριέχει βλαστικά κύτταρα υπεύθυνα για την αντικατάσταση και την επανόρθωση του. Τα πρώτα βλαστικά κύτταρα που απομονώθηκαν από οδοντικούς ιστούς ορίστηκαν ως βλαστικά κύτταρα του οδοντικού πολφού - dental pulp stem cells, DPSCs. Απομονώθηκαν για πρώτη φορά (ανθρώπινα) το 1997 και χαρακτηρίστηκαν μετά το 2000¹³.

Έχουν παρόμοιες ιδιότητες με τα βλαστοκύτταρα στρώματος του μυελού των οστών αλλά μεγαλύτερο δυναμικό πολλαπλασιασμού. Παρόμοιες καλλιέργειες, προερχόμενες από τρίτους γομφίους στη φάση της διάπλασης της ρίζας, επέδειξαν την δυνατότητα διαφοροποίησης σε κύτταρα προσομοιάζοντα σε οδοντοβλάστες με υψηλή ικανότητα μετανάστευσης και ενασβεστίωσης, η οποία οδήγησε σε οργανωμένες τρισδιάστατες δομές όμοιες με οδοντίνη σε συνθήκες *in vitro*. Το χαρακτηριστικό αυτό πιθανό να προκύπτει από το γεγονός ότι οι 3οι γομφίοι είναι το τελευταίο δόντι της μόνιμης οδοντοφυΐας που διαπλάθεται και ανατέλλει στο φραγμό, επομένως διαθέτουν κύτταρα πιο πρώιμα σε σχέση με αυτά του μυελού των οστών.

Σε αποικίες DPSCs παρατηρούνται διαφορετικές κυτταρικές πυκνότητες γεγονός το οποίο καταδεικνύει ότι κάθε κύτταρο κλώνος, εμφανίζει διαφορετικό ρυθμό πολλαπλασιασμού. Επιπλέον μέσα στην ίδια αποικία εμφανίζονται κύτταρα

με διαφορετική μορφολογία και μέγεθος. Η διαφοροποίηση αυτή καθορίζεται κυρίως από ένα σύνολο παραγόντων όπως αυξητικοί παράγοντες, μόρια δέκτες, σηματοδοτικά μόρια, παράγοντες μεταγραφής και εξωκυττάρια πρωτεΐνες δικτύου. που αποτελούν το μικροπεριβάλλον του κυττάρου. Τα DPSCs τελικά μπορούν να οδηγήσουν σε κυτταρικές σειρές οδοντινοβλαστών, οστεοβλαστών, χονδροκυττάρων, μυοκυττάρων, νευρικών κυττάρων, λιποκυττάρων, επιθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς, κυττάρων μελανώματος και βλαστικών κυττάρων με επαγόμενη πολυδυναμία - induced pluripotent stem cells, iPS cells^{14,15}. Έχειδειχτεί ότι η στρωματική πρωτεΐνη οδοντίνης, μια μη κολλαγονούχος εξωκυττάρια πρωτεΐνη στρώματος προερχόμενη από την οδοντίνη, μπορεί να προάγει σημαντικά τη διαφοροποίηση DPSCs σε οδοντινοβλάστες και το σχηματισμό επανορθωτικής οδοντίνης επί αποκαλυμμένου πολφικού ιστού. Επιπλέον μπορεί να γίνει επαγωγή DPSCs σε σειρές οδοντινοβλαστών όταν δεχτούν την επίδραση του μεταμορφωτικού παράγοντα $\beta 1$ - transforming growth factor $\beta 1$ (TGF β 1) – μόνου του ή σε συνδυασμό με τον παράγοντα αύξησης ινοβλαστών – fibroblast growth factor (FGF)¹⁶. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα DPSCs παίζουν σημαντικό ρόλο στις αναγεννητικές διαδικασίες του συμπλέγματος πολφού-οδοντίνης. Σε πειραματική εργασία , όταν DPSCs εμφυτεύθηκαν σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια δημιούργησαν ένα σύμπλεγμα, παρόμοιο με αυτό του πολφού-οδοντίνης, το οποίο αποτελείτο από ένα ενασβεστωμένο πλέγμα, με σωληνάρια επενδυμένα

με οδοντοβλάστες, και ινώδη ιστό που περιείχε αγγεία σε διάταξη παρόμοια με αυτήν των φυσιολογικών ανθρωπίνων δοντιών¹³. Σε άλλη εργασία SCAP και PDLSCs κατέστη δυνατό να δώσουν έναν ριζόμορφο σχηματισμό όταν τοποθετήθηκαν σε έναν μεταφορέα με βάση τον υδροξυαπατίτη και το φωσφορικό ασβέστιο και εμφυτεύθηκαν σε γνάθους χοίρων. Τα PDLSCs εμπεριέχονταν σε μια αφρώδη γέλη η οποία κάλυψε την εξωτερική επιφάνεια του μεταφορέα πριν την εμφύτευση. Τα SCAP τοποθετήθηκαν στο εσωτερικό του μεταφορέα. Οχτώ εβδομάδες μετά την εμφύτευση τα PDLSCs μπόρεσαν να σχηματίσουν οστεΐνη στην επιφάνεια του μεταφορέα. Τρεις μήνες αργότερα , μετά από έλεγχο με υπολογιστική τομογραφία , διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενός ριζόμορφου σχηματισμού και περιριζικός χώρος . Στον σχηματισμό αυτό συγκολλήθηκε μια προκατασκευασμένη στεφάνη από πορσελάνη η οποία κατάφερε να ανταποκριθεί στις μασητικές λειτουργίες για τέσσερις εβδομάδες. Στη συνέχεια τα ευρήματα της υπολογιστικής τομογραφίας επαληθεύτηκαν και ιστολογικά επιβεβαιώνοντας ότι η δομή ρίζας – περιοδοντίου είχε αναγεννηθεί¹⁸.

ii. Βλαστικά κύτταρα νεογιλών δοντιών - Stem cells from exfoliated and deciduous teeth (SHED)

Το 2003, οι Miura και συν., παρουσίασαν την ύπαρξη πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων μεσεγχυματικού τύπου στον οδοντικό πολφό νεογιλών δοντιών. Για την απομόνωση αυτών των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν τομείς παιδιών 7-8 ετών και

φάνηκε ότι τα SHED έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιούνται *in vitro* σε νευρικά κύτταρα, οδοντοβλάστες, οστεοβλάστες και λιποκύτταρα. Με βάση πειράματα εμφύτευσης σε ποντίκια βρέθηκε ότι τα SHED μπορούν να παράγουν οδοντίνη, όπως επίσης και οστό. Σε αντίθεση με τα DPSCs δεν κατέστη δυνατό να σχηματίσουν κάποιο σύμπλεγμα πολφού-οδοντίνης.

Τα νεογιλά δόντια είναι διαφορετικά από τα μόνιμα όσον αφορά τις αναπτυξιακές διεργασίες, τη δομή των ιστών και τη λειτουργία τους. Τα SHED έχουν υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού, μεγαλύτερη οστεογεννητική ικανότητα *in vivo* και αδυναμία στο να σχηματίσουν σύμπλεγμα πολφού οδοντίνης¹⁸.

Με βάση τα παραπάνω, πολλές έρευνες προτείνουν τη χρήση SHEDs στην μηχανική οδοντικών ιστών. Οι Cordeiro και συν., προτείνουν ότι τα SHEDs μπορεί να αποτελούν την ιδανική πηγή βλαστικών κυττάρων για την επιδιόρθωση κατεστραμμένων οδοντικών ιστών, όπως επίσης και για την προαγωγή σχηματισμού οστού. Σε πείραμά της η ομάδα αυτή τοποθέτησε SHEDs σε βιοδιασπώμενο ικρίωμα πολύ-λ-λακτικού οξέος (PLLA) παρασκευασμένο μέσα σε τομές ανθρώπινων δοντιών και εμφύτευσε στη συνέχεια τον όλο σχηματισμό υποδόρια σε ποντίκια. Τα SHEDs διαφοροποιήθηκαν σε οδοντοβλάστες και όταν έγινε προσθήκη ενδοθηλιακών κυττάρων πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός του ικριώματος με αγγεία¹⁹. Με βάση τα παραπάνω, βλάβες της οδοντίνης και του

πολφού θα μπορούσαν μελλοντικά να επιδιορθώνονται με τη χρήση αυτολόγων βλαστικών κυττάρων της νεογιλής οδοντοφυΐας, τα οποία θα έχουν διατηρηθεί σε τράπεζες κυττάρων. Ερωτήματα εγείρονται σχετικά με το ποιες είναι οι δυνατότητες μια πιθανής χρήσης ετερολόγων βλαστικών κυττάρων.

iii. Βλαστικά κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου - Periodontal ligament stem cells (PDLSCs)

Ο περιοδοντικός σύνδεσμος βρίσκεται μεταξύ οστεΐνης και φατνιακού οστού και αποτελείται από τις ίνες του περιριζίου οι οποίες συγκρατούν το δόντι στο φατνίο. Μπορεί να απομονωθεί από ρίζες εξαγμένων δοντιών και περιέχει βλαστικά κύτταρα τα PDLSCs τα οποία διαφοροποιούνται με σκοπό να δώσουν ιστούς όπως οστεΐνη και φατνιακό οστό. In vitro διαφοροποιούνται σε λιποκύτταρα, οστεοβλάστες, και χονδροκύτταρα²⁰.

Μετά από εμφύτευση σε ποντίκια, τα PDLSCs, μπόρεσαν να σχηματίσουν δομές παρόμοιες με οστό, οστεΐνη, χόνδρο και περιοδοντικό σύνδεσμο. Σε άλλη μελέτη σε χοίρους, PDLSCs χρησιμοποιήθηκαν για τη θεραπεία περιοδοντικής νόσου.

Περαιτέρω, όπως προαναφέρθηκε, όταν PDLSCs συνδυάστηκαν με SCAPs προερχόμενα από τρίτους γομφίους, τοποθετήθηκαν σε ικρίωμα και εν συνεχεία εμφυτεύτηκαν σε φατνιακό οστό νεαρών χοιριδίων, δημιουργήθηκε ένας ριζόμορφος σχηματισμός με περιοδοντική συσκευή, ο οποίος κατέστη δυνατό να

υποστηρίζει μια τεχνητή κεραμική στεφάνη, εξασφαλίζοντας μια ομαλή οδοντική λειτουργία¹⁸.

Σε πιο πρόσφατη μελέτη των Orciani et al., φάνηκε ότι ανθρώπινα PDLSCs διαφοροποιήθηκαν σε οστεοβλάστες και επέδειξαν υψηλή παραγωγή ιόντων ασβεστίου και νιτρικού οξέος. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις προτείνεται πως τοπική εμφύτευση PDLSCs στο στάδιο του πολλαπλασιασμού σε συνδυασμό με νιτρικό οξύ θα μπορούσε να αποτελέσει μια υποσχόμενη θεραπευτική μέθοδο για την αντιμετώπιση περιοδοντικών βλαβών²¹. Με άλλη μελέτη φαίνεται ότι τα PDLSCs που προηγουμένως είχαν καλλιεργηθεί με APTG-CM (apical tooth germ cells) μπόρεσαν να σχηματίσουν δομές οστεΐνης – περιοδοντικού συνδέσμου μετά από εμφύτευση σε ποντίκια²². Από τα παραπάνω φαίνεται ότι ο περιοδοντικός σύνδεσμος είναι μια εναλλακτική πηγή βλαστικών κυττάρων, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε κυτταρικές θεραπείες για την αντιμετώπιση βλαβών στη στοματική περιοχή.

iv. Βλαστικά κύτταρα του οδοντοθυλακίου - Dental follicle stem cells (DFSCs)

Το οδοντοθυλάκιο περιβάλλει το υπό ανάπτυξη δόντι και παίζει σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό της οστεΐνης, του περιοδοντικού συνδέσμου και του φατνιακού οστού. Τα DFSCs απομονώθηκαν από οδοντοθυλάκια τρίτων γομφίων και καταγράφηκε ότι μπορούν να παραμείνουν σε κυτταρικές καλλιέργειες μέχρι το

15ο πέραςμα. Τα DFSCs διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες, λιποκύτταρα και νευρικά κύτταρα invitro. Επίσης παράγουν οστεΐνη in vivo. Εμφύτευση DFSCs σε ποντίκια οδήγησε σε σχηματισμό νέου περιοδοντικού συνδέσμου σε χρονικό διάστημα τεσσάρων εβδομάδων²³. Αυτά τα κύτταρα μπορεί να είναι ένα νέο εργαλείο για τη μελέτη της ανάπτυξης του περιοδοντικού συνδέσμου και την εξέλιξη αναγεννητικών θεραπευτικών τεχνικών²⁴.

v. Βλαστικά κύτταρα της οδοντικής θηλής - Stem cells from the apical papilla (SCAP)

SCAPs είναι τα βλαστικά κύτταρα τα οποία προέρχονται από την ακρορριζική θηλή, που είναι ο πρόδρομος ιστός του οδοντικού πολφού. Σημαντική πηγή SCAP είναι οι τρίτοι γομφίοι και δόντια με αδιάπλαστο ακρορρίζιο. Έχει βρεθεί ότι τα SCAP μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οστεοβλάστες, οδοντοβλάστες ή οδοντινοβλάστες και λιποκύτταρα invitro, ενώ in vivo σε οστεοβλάστες και οδοντοβλάστες. Έχει γίνει γνωστό ότι τα SCAP διαθέτουν υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού και είναι πιο αποδοτικά σε σχέση με τα DPSCs, όσον αφορά τον σχηματισμό δοντιού. Επιπλέον εμφύτευση SCAP και PDLSCs μαζί με HA/TGT (hydroxyapatite/tricalciumphosphate) σαν μεταφορέα σε ποντίκια οδήγησε στο σχηματισμό οδοντίνης, οστεΐνης και ινών του Sharpey. Με αυτά φαίνεται ότι συνδυασμός μεσεγχυματικών κυττάρων μπορεί να οδηγήσει στην

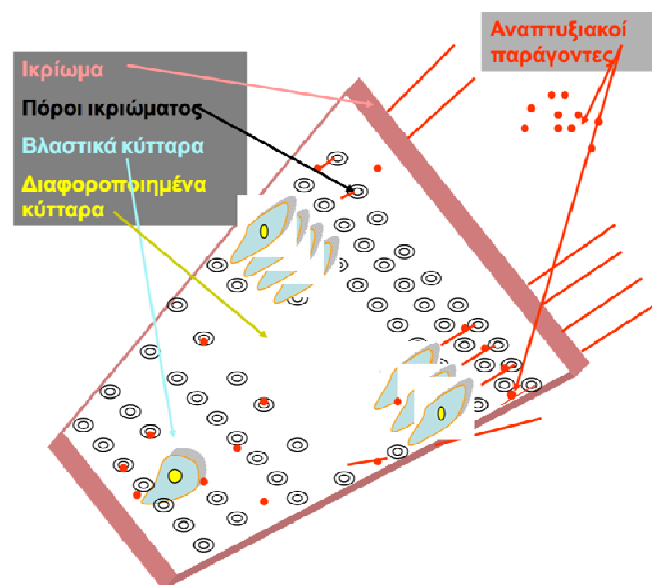
ανάπλαση του συμπλέγματος ρίζας - περιοδοντικού συνδέσμου. SCAP πιστεύεται ότι είναι και τα κύτταρα που συμμετέχουν κυρίως στην επαναγγείωση²⁵.

Γ. Ικρίώματα

Το ικρίωμα έχει ως σκοπό να προσφέρει ένα φυσικοχημικό και βιολογικό μικροπεριβάλλον για την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των κυττάρων, προάγοντας την πρόσφυση και την δυνατότητα μετανάστευσης τους (Εικ.3). Το ικρίωμα πρέπει να διαθέτει ορισμένες ιδιότητες για να εξυπηρετεί τους σκοπούς της χρήσης του. Έτσι χρειάζεται να είναι βιοσυμβατό και βιοδιασπώμενο σε ελεγχόμενο ρυθμό και με μη τοξικά προϊόντα διάσπασης. Επίσης πρέπει να είναι ιδιαίτερα πορώδες και με τέτοια αρχιτεκτονική δομή που να επιτρέπει την μεταφορά θρεπτικών συστατικών, οξυγόνου και αποβλήτων. Επιπλέον πρέπει να έχει καλές μηχανικές ιδιότητες με αντοχή στην τάση και την πίεση. Είναι ακόμα ανάγκη να μπορεί να χρησιμοποιηθεί κλινικά. Τέλος είναι επιθυμητό να μπορεί να απελευθερώνει αυξητικούς παράγοντες και γονιδιακά μηνύματα με την πάροδο του χρόνου²⁶. Το ικρίωμα μπορεί να είναι σε μορφή πλέγματος, ινών, πορώδους στερεού ή γέλης²⁷. Στα ικρίωματα που χρησιμοποιούνται συμπεριλαμβάνονται φυσικά πολυμερή όπως το κολλαγόνο και η γλυκοσαμινογλυκάνη, τα οποία προσφέρουν καλή βιοσυμβατότητα και συνθετικά υλικά όπως πολυλακτικό οξύ (PLA), πολυγλυκολικό οξύ (PGA) και το συμπολυμερές τους (PLGA), τα οποία

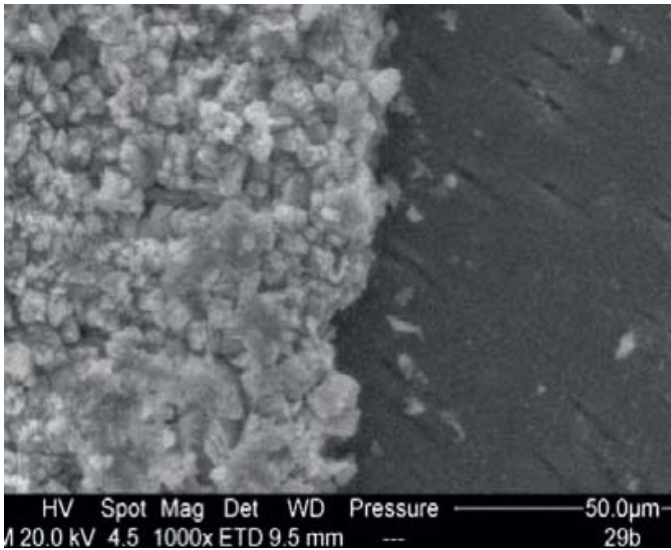
διαθέτουν καλά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά²⁸. Σε μορφή γέλης συναντάμε πολυμερή βασισμένα στην πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) ,όπως επίσης και κάποιους τύπους οι οποίοι έχουν τροποποιηθεί με πεπτίδια που προάγουν την πρόσφυση των κυττάρων (RGD)²⁹. Τέτοια πεπτίδια είναι η αργινίνη, η γλυκίνη και το ασπαρτικό οξύ. Ικρίώματα που περιέχουν ανόργανα συστατικά, όπως υδροξυαπατίτη και φωσφορικό ασβέστιο, χρησιμοποιούνται για να ενισχυθεί η οστική εναπόθεση³⁰. Αξιόλογα αποτελέσματα έχουν δώσει ικρίώματα τα οποία περιέχουν βιοενεργά συστατικά όπως η βιοενεργός ύαλος(bioactive glass ή bioglass ή bioceramics).Η βιοενεργός ύαλος απελευθερώνει σταδιακά ιόντα, τα οποία στη συνέχεια ενεργοποιούν γονίδια που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό³¹. Επίσης παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση³². Η πρώτη βιοενεργός ύαλος παρουσιάστηκε το 1971. Τα κύρια συστατικά της ήταν το SiO₂, το CaO, το P₂O₅ και το Na₂O. Σήμερα μπορούμε να βρούμε διαφορετικά είδη bioglass όσον αφορά τη σύσταση, τις αναλογίες των επιμέρους στοιχείων, τη μορφή και τη μέθοδο παρασκευής³³. Πρόσφατα παρήχθη βιοενεργός ύαλος σε μορφή γέλης – αφρού με σκοπό τη χρήση σε αναγεννητικές τεχνικές. Αυτή η μορφή bioglass συνδυάζει την ύπαρξη μεγάλων πόρων, για την προαγωγή της αγγειοποίησης και την βιοενεργό δράση³⁴. Η προσθήκη βιουάλου σε διάφορων ειδών ικρίώματα έχει δώσει βελτιωμένα αποτελέσματα όσον αφορά την αναγέννηση ιστών και την αγγειοποίηση του^{35,36,37}. Υλικά που μπορεί να παίζουν

το ρόλο πιθανού ικκρίωματος είναι τα MTA, Biodentin, Bioceramic και άλλα. Το κάθε ένα παρουσιάζει ιδιαίτερες ιδιότητες και σύνθεση. Κοινό χαρακτηριστικό στη σύνθεση είναι η παρουσία πυριτίου. Στην ύπαρξη αυτού αλλά και στην ιδιάζουσα μορφολογία της επιφάνειας τους αποδίδεται η βιοεπεγωγική ιδιότητα τους. Πέραν τούτου και η ελεύθερη επιφάνεια της οδοντίνης κυρίως επί απουσίας οδοντινικού επιχρίσματος αποτελεί πιθανό ικκρίωμα με την ευρύτερη έννοια του όρου³⁸.

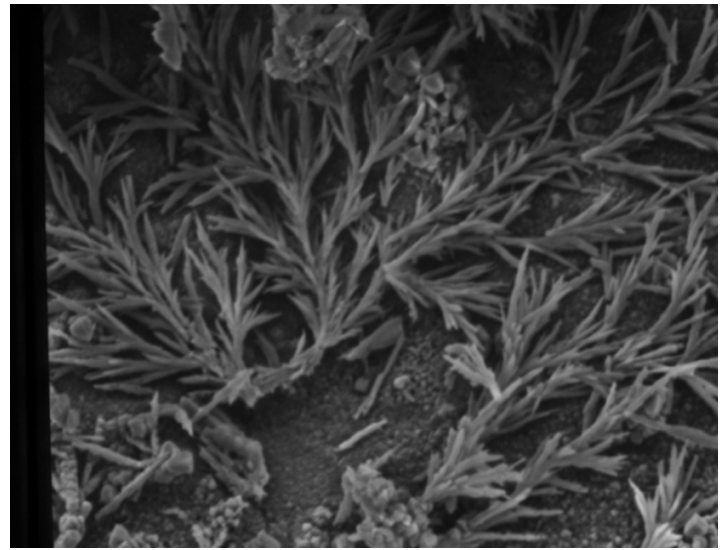


Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση της δομής και λειτουργίας ενός ικκρίωματος.

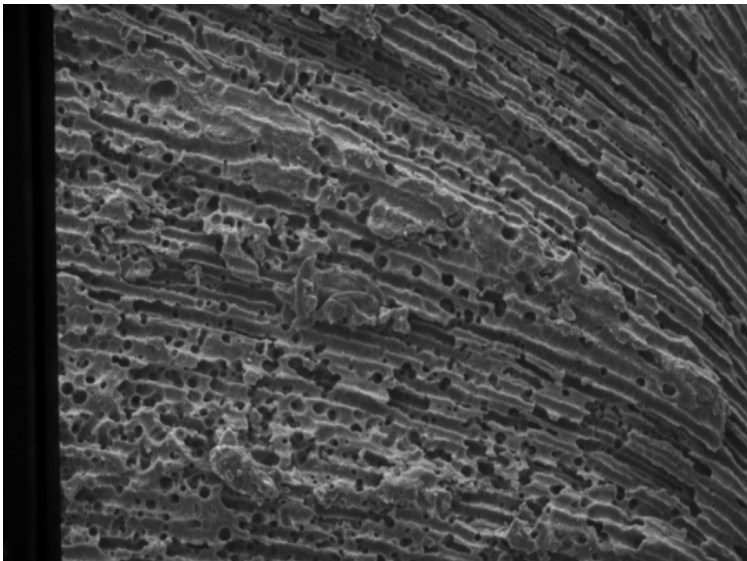
A



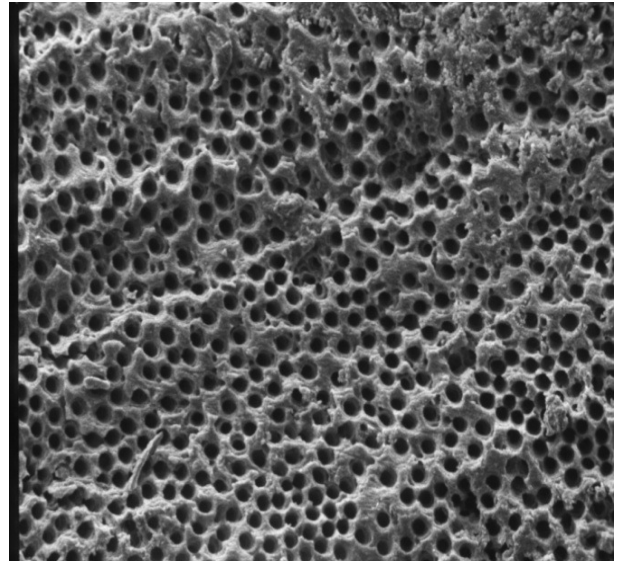
B



Γ



Δ



Εικ.4. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης - SEM της επιφάνειας των MTA (A), Biodentin (B), και της καθαρής επιφάνειας οδοντίνης (Γ,Δ)

Δ. Αναπτυξιακοί παράγοντες

Οι αναπτυξιακοί παράγοντες είναι πρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται με υποδοχείς

του κυττάρου και προάγουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή του (Πίνακας 1.)⁴. Μπορούν να επιδρούν σε διαφορετικά κύτταρα ή να παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς τη δράση τους³⁹. Οι μορφογενετικές πρωτεΐνες του οστού (BMPs) και η υπερικογενεία του τροποποιητικού αυξητικού παράγοντα β (transforming growth factor beta-TGFβ) είναι από τα σημαντικότερα στοιχεία όσον αφορά τα κυτταρικά μηνύματα της διαφοροποίησης των οδοντοβλαστών. Έχει βρεθεί ότι διάφοροι τύποι αυτών των παραγόντων προκαλούν και ενισχύουν τη διαφοροποίηση σε οδοντοβλάστες και σε άλλες περιπτώσεις προάγουν την παραγωγή επανορθωτικής οδοντίνης⁴⁰.

Ο TGFβ1 σε πειράματα in vitro έχει βρεθεί ότι ενισχύει την διαφοροποίηση των hDPSCs σε οδοντοβλάστες⁴¹. Επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στους αμυντικούς μηχανισμούς των κυττάρων του πολφού και στην παραγωγή επανορθωτικής οδοντίνης^{42,43}. Ο TGFβ2 σε πειραματόζωα επιτάχυνε την παραγωγή οδοντίνης⁴⁴. Ο TGFβ3 πιθανόν να ρυθμίζει την διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων σε οδοντοβλάστες και να συμμετέχει σε επανορθωτικές διαδικασίες του πολφού⁴⁵. Από τις BMPs η BMP2 έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στην διαφοροποίηση των οδοντοβλαστών κατά την οδοντική διάπλαση⁴⁶. Επιπλέον σε συνθήκες in vitro προάγει και επιταχύνει την διαφοροποίηση πολφικών κυττάρων σε οδοντοβλάστες⁴⁷. Σε άλλη μελέτη φαίνεται να ρυθμίζει την παραγωγή επανορθωτικής οδοντίνης⁴⁸. Η BMP4 παίζει ρόλο στον σχηματισμό του ελύτρου

του Hertwig κατά την οδοντική ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση των οδοντοβλαστών και την παραγωγή επανορθωτικής οδοντίνης^{49,50}.

Η BMP7 σε πρόσφατη έρευνα φάνηκε να προάγει την διαφοροποίηση DPSCs σε οδοντοβλάστες⁵¹. Επίσης σε πειραματόζωα συμβάλλει στην παραγωγή επανορθωτικής οδοντίνης⁵². Μεταφορά BMP11 σε οδοντικό πολφό αύξησε την διαφοροποίηση των οδοντοβλαστών⁵³. Άλλοι αυξητικοί παράγοντες με πιθανή συμβολή στην οδοντική ανάπτυξη και σε επανορθωτικές διαδικασίες είναι ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (NGF)⁵⁴, οι αυξητικοί παράγοντες διαφοροποίησης (GDF) και ο νευροτροπικός παράγοντας (GDNF)⁵⁵.

Στο χώρο της Αναγεννητικής Ενδοδοντολογίας έχουν επινοηθεί και προταθεί διάφορες θεραπευτικές τεχνικές όπως: εμφύτευση βλαστικών κυττάρων, εμφύτευση εργαστηριακά κατασκευασμένου πολφού, τρισδιάστατη τυποποίηση κυττάρων, εργαστηριακή παρασκευή οδοντικών ιστών, κ.ά. Όμως η μόνη θεραπευτική μέθοδος, η οποία εφαρμόζεται στην κλινική πράξη είναι η αναγεννητική ενδοδοντική θεραπεία για δόντια με αδιάπλαστη ρίζα. Αυτή η τεχνική έχει αναφερθεί επίσης ως επαναγγείωση του πολφού (pulp revascularization), αναγέννηση του πολφού (pulp regeneration) ή επανάκτηση ζωτικότητας πολφού (pulp revitalization)⁴.

Abbreviation	Factor	Primary Source	Activity	Usefulness
BMP	Bone morphogenetic proteins	Bone matrix	BMP induces differentiation of osteoblasts and mineralization of bone	BMP is used to make stem cells synthesize and secrete mineral matrix
CSF	Colony stimulating factor	A wide range of cells	CSFs are cytokines that stimulate the proliferation of specific pluripotent bone stem cells	CSF can be used to increase stem cell numbers
EGF	Epidermal growth factor	Submaxillary glands	EGF promotes proliferation of mesenchymal, glial and epithelial cells	EGF can be used to increase stem cell numbers
FGF	Fibroblast growth factor	A wide range of cells	FGF promotes proliferation of many cells	FGF can be used to increase stem cell numbers
IGF	Insulin-like growth factor-I or II	I - liver II-variety of cells	IGF promotes proliferation of many cell types	IGF can be used to increase stem cell numbers
IL	Interleukins IL-1 to IL-13	Leukocytes	IL are cytokines which stimulate the humoral and cellular immune responses	Promotes inflammatory cell activity
PDGF	Platelet-derived growth factor	Platelets, endothelial cells, placenta	PDGF promotes proliferation of connective tissue, glial and smooth muscle cells	PDGF can be used to increase stem cell numbers
TGF- α	Transforming growth factor-alpha	Macrophages, brain cells, and keratinocytes	TGF- α may be important for normal wound healing	Induces epithelial and tissue structure development
TGF- β	Transforming growth factor-beta	Dentin matrix, activated TH ₁ cells (T-helper) and natural killer (NK) cells	TGF- β is anti-inflammatory, promotes wound healing, inhibits macrophage and lymphocyte proliferation	TGF- β 1 is present in dentin matrix and has been used to promote mineralization of pulp tissue
NGF	Nerve growth factor	A protein secreted by a neuron's target tissue	NGF is critical for the survival and maintenance of sympathetic and sensory neurons.	Promotes neuron outgrowth and neural cell survival

Πίνακας 1. Οι κυριότεροι αναπτυξιακοί παράγοντες σύμφωνα με το άρθρο των Murray *P et al.* J Endod 2007; 33: 377–90

2. Η Αναγεννητική Ενδοδοντολογία στην κλινική πράξη

Επαναγγείωση του ριζικού σωλήνα μέσω αιματικού θρόμβου. Από τη δεκαετία του 70 έχουν δημοσιευθεί εργασίες και περιστατικά στα οποία δόντια αποκτούν επαναγγείωση στο ακρορριζικό τμήμα του ριζικού σωλήνα αν μείνει χωρίς έμφραξη μετά από πολφεκτομή⁵⁶. Επίσης έχει παρατηρηθεί η συνέχιση της διάπλασης της ρίζας σε εκγομφωμένα δόντια με αδιάπλαστο ακρορρίζιο⁵⁷. Η μελέτη τέτοιων περιστατικών οδήγησε στην προσπάθεια πιο συγκεκριμένων

αναγεννητικών τεχνικών στη σύγχρονη Ενδοδοντολογία. Από την προηγούμενη δεκαετία άρχισαν να δημοσιεύονται αρκετές περιγραφές περιστατικών στις οποίες εμφανίζεται αναγέννηση νεκρωτικού πολφικού συστήματος δοντιών με αδιάπλαστο ακρορρίζιο έπειτα από απολύμανση, ακολουθούμενη από προκλητή αιμορραγία του ριζικού σωλήνα, μέσω υπερδιεύρυνσης του⁵⁸⁻⁶⁰. Για την απολύμανση του ριζικού σωλήνα χρησιμοποιείται ελάχιστη ή μηδαμινή επεξεργασία με μικροεργαλεία. Πραγματοποιούνται όμως διακλυσμοί με υποχλωριώδες νάτριο - NaOCl - 2,5-5,25%, υπεροξείδιο του υδρογόνου - H₂O₂ - 3% και χλωρεξιδίνη. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με τοποθέτηση ίσων μερών μετρονιδαζόλης, μινοκυκλίνης και σιπροφλοξασίνης σε μορφή πάστας με συγκέντρωση 20mg/ml⁶¹⁻⁶². Το υδροξείδιο του ασβεστίου αρχικά αποτελούσε αντένδειξη προκειμένου να αποφευχθεί η καταστροφή του υπολειπομένου πολφικού ιστού, της οδοντικής θηλής και του ελύτρου του Hertwig λόγω του υψηλού pH. Η δημοσίευση όμως σειράς επιτυχημένων κλινικών περιστατικών με χρήση υδροξειδίου του ασβεστίου θέτει αυτήν την υπόθεση υπό αμφισβήτηση⁶³⁻⁶⁵. Η ήπια αυτή θεραπεία έχει ως σκοπό την διατήρηση ιστών που πιθανόν περιέχουν βλαστικά κύτταρα. Τέτοιοι ιστοί είναι ο οδοντικός πολφός ο οποίος μπορεί να περιέχει DPSCs και η οδοντική θηλή που μπορεί να περιέχει SCAP. Η διατήρηση του ελύτρου του Hertwig επίσης είναι σημαντική καθώς μπορεί να συμβάλλει στον σχηματισμό της ρίζας. Η αντιμικροβιακή πάστα εισάγεται σε μήκος λίγο

μυλκότερο από το όριο των ζωντανών ιστών και στην συνέχεια τοποθετείται προσωρινό εμφρακτικό υλικό π.χ Cavit πάχους 3mm κατ' ελάχιστο. Η κοιλότητα εμφράσσεται με υαλοϊονομερή κονία. Ο ασθενής προσέρχεται μετά την πάροδο δυο εβδομάδων για επανεξέταση. Αν το δόντι είναι ασυμπτωματικό αφαιρείται η έμφραξη και επανεξετάζεται ο ριζικός σωλήνας. Αν δεν παρατηρηθεί εξίδρωμα πραγματοποιούνται εκ νέου διακλυσμοί με NaOCl, χλωρεξιδίνη, αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ - EDTA και στη συνέχεια με φυσιολογικό ορό. Η δημιουργία αιματικού θρόμβου στον ριζικό σωλήνα 3 χιλιοστά ακρορριζικότερα της αδαμαντινο-οστεϊνικής ένωσης (εικόνα 5), παρόλο που συμπεριλαμβάνεται στην τεχνική, προβληματίζει για την χρησιμότητά της. Ο θρόμβος από μόνος του αποτελεί μια μορφή ικρίώματος και επιπρόσθετα εξασφαλίζει την ύπαρξη κυττάρων. Η άποψη αυτή όμως δεν στηρίζεται σε ιστολογικά και στατιστικά δεδομένα και επιπλέον η προσπάθεια δημιουργίας του θρόμβου ενέχει τον κίνδυνο τραυματισμού της οδοντικής θηλής και άλλων ιστών της ακρορριζικής περιοχής⁶⁶. Βέβαια πολλοί υποστηρίζουν ότι ένας ήπιος τραυματισμός βοηθάει στον ερεθισμό των κυττάρων και δίνει το έναυσμα για την έναρξη της διαφοροποίησης. Επομένως έχει τεθεί ερώτημα όσον αφορά την δημιουργία ή μη αιματικού θρόμβου. Εν συνεχεία τοποθετείται MTA πάχους 3-4 χιλιοστών μυλικά του αιματικού θρόμβου είτε σε άμεση επαφή ή με την παρεμβολή μικρού τεμαχίου σπόγγου κολλαγόνου και τελικά η κοιλότητα εμφράσσεται με υαλοϊονομερή

κονία. Το MTA προτιμάται για την άριστη βιοσυμβατότητά του, την πολύ καλή συμπεριφορά του στη μικροδιείσδυση και την πρόσφυση που παρουσιάζουν στο υλικό αυτό τα κύτταρα⁶⁷.

Η έμφραξη με υαλοϊονομερή κονία ενισχύει την μυλική αποκατάσταση. Θα πρέπει να γίνονται συχνές επανεξετάσεις για την επίβλεψη της προόδου του σχηματισμού της ρίζας. Αν υπάρχει συνέχιση των συμπτωμάτων, δημιουργία συριγγίου, οίδημα και μη εμφάνιση βελτίωσης η διαδικασία θα πρέπει να εγκαταλείπεται και να ακολουθείται διαδικασία προκλητής ακρορριζικής απόφραξης. Ο μηχανισμός με τον οποίο επιτελείται ο σχηματισμός της ρίζας στην παραπάνω διαδικασία δεν έχει διευκρινιστεί. Πιστεύεται πάντως ότι η ακρορριζογένεση πραγματοποιείται είτε με DPSCs τα οποία περιέχονται σε υπολείμματα πολφού ή σε PDLSCs τα οποία μεταναστεύουν στο χώρο του ριζικού σωλήνα ή σε SCAP που ανευρίσκονται στην οδοντική θηλή του ακρορριζίου και έχει αναφερθεί ότι είναι κύτταρα με ιδιαίτερη αντοχή στη φλεγμονή.

Παρόλο που τέτοια περιστατικά αναφέρονται στην πλειοψηφία τους σε δόντια με αδιάπλαστο ακρορρίζιο πιστεύεται ότι μπορεί να εφαρμοσθεί σε δόντια με κλειστό ακρορρίζιο αν αυτό διευρυνθεί σε μέγεθος από 1–2 χιλιοστά. Αυτή η διεύρυνση πιστεύεται ότι θα επιτρέψει την είσοδο αίματος το οποίο θα δημιουργήσει θρόμβο που θα περιέχει κύτταρα ικανά να οδηγήσουν στην παραγωγή νέου ιστού⁶⁸.



Εικόνα 5. Σχηματισμός αιματικού θρόμβου ελαφρά χαμηλότερα του ύψους της αδαμαντινοοστεϊνικής ενώσεως (αρχείο Ε. Κοντακιώτη)

Σε τέτοια περιστατικά έχει περιγραφεί συνεχιζόμενος σχηματισμός ρίζας και αποκατάσταση της αίσθησης του θερμού⁵⁹. Εξάλλου πρόσφατη έρευνα υποστηρίζει ότι εν τέλει το μέγεθος του ακρορριζικού τρήματος δεν έχει καμμία επίδραση όσον αφορά την επιτυχία της αναγεννητικής τεχνικής⁶⁹.

Από μελέτη της διεθνούς βιβλιογραφίας σχετικά με τα εφαρμοζόμενα

πρωτόκολλα σχηματίστηκε ο πίνακας 2.

	Irrigation	Intracanal medicament	Blood clot	Collagen sponge	Coronal barrier
Iwaya et al, 2001	5% NaOCl 3% H ₂ O ₂	Metronidazole, Ciprofloxacin	No	No	Ca(OH) ₂
Banchs and Trope, 2004	5,25% NaOCl 0,12% CHX	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	MTA
Cheung & Huang, 2006	2,5% NaOCl	Ca(OH) ₂	No	No	Ca(OH) ₂
Thibodeau and Trope, 2007	1,25% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Cefaclor	Yes	No	MTA
Petrino 2007	5,25% NaOCl 0,12% CHX	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	MTA
Shah et al, 2007	2,5% NaOCl 3% H ₂ O ₂	Formocresol	Yes	No	GIC
Cotti et al. 2008	5,25% NaOCl 3% H ₂ O ₂	Ca(OH) ₂	Yes	No	MTA
Reynolds et al, 2009	6% NaOCl 2% CHX	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	MTA

	Irrigation	Intracanal medicament	Blood clot	Collagen sponge	Coronal barrier
Thibodeau, 2009	1,25% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Cefaclor	Yes	No	MTA
Ding et al, 2009	5,25% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	MTA
Chueh et al, 2009	2,5% NaOCl	Ca(OH) ₂	No	No	MTA Ca(OH) ₂
Thomson & Kahler, 2010	1%NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Amoxicillin	Yes	No	MTA
Kim et al, 2010	3% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	MTA
Petrino et al, 2010	5,25% NaOCl 0,12% CHX	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	MTA
Iwaya et al, 2011	5% NaOCl 3% H2O2	Ca(OH) ₂	No	No	Ca(OH) ₂
Cehreli et al, 2011	2,5% NaOCl	Ca(OH) ₂	Yes	No	MTA
Jung et al, 2011	2,5% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	MTA

	Irrigation	Intracanal medicament	Blood clot	Collagen sponge	Coronal barrier
Torabinejad & Turman, 2011	5,25% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	No	No	MTA
Nosrat et al, 2011	5,25% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	C.E.M. cements
Chen et al, 2012	5,25% NaOCl	Ca(OH) ₂	Yes	No	MTA
Nosrat et al, 2012	5,25% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	No	No	MTA
Shimizu et al, 2012	5,25% NaOCl	Ca(OH) ₂	Yes	No	MTA
Lenzi & Trope, 2012	2,5% NaOCl Solution of antibiotics	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	MTA
Torabinejad & Faras, 2012	5,25% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	No	No	MTA
Aggarwal et al, 2012	5,25% NaOCl 2% CHX	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	MTA

	Irrigation	Intracanal medicament	Blood clot	Collagen sponge	Coronal barrier
Shivashankar et al, 2012	5,25% NaOCl 0,2% CHX	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	No	No	MTA
Kim et al, 2012	3% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Cefaclor	Yes	No	MTA
Miller et al, 2012	2%CHX 17%EDTA	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	MTA
Gelman & Park, 2012	6% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	MTA
Jeeruphan et al, 2012	2,5% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	CollaPlug	MTA
Narayana et al, 2012	5,25% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	MTA
Mc Tigue et al, 2013	3% NaOCl 0,12%CHX	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline or Metronidazole, Ciprofloxacin, Clindamycin	Yes	No	MTA

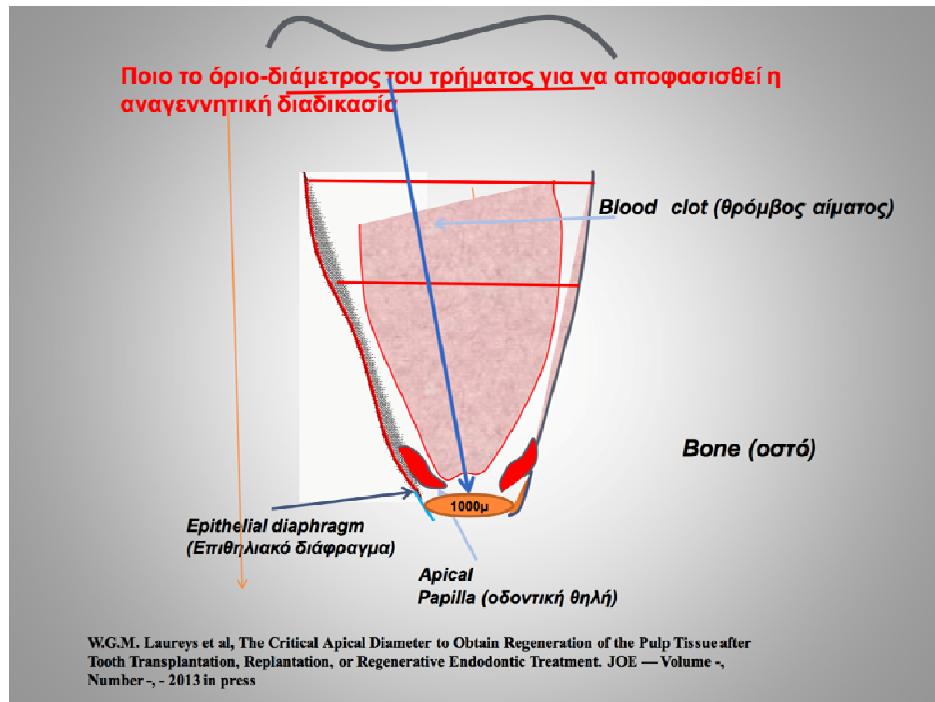
	Irrigation	Intracanal medicament	Blood clot	Collagen sponge	Coronal barrier
Nosrat et al, 2013	2,5% NaOCl	Ca(OH) ₂ Amoxicillin	Yes	Collacote	MTA
Martin et al, 2013	5,25% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	MTA
Soares et al, 2013	2%CHX	Ca(OH) ₂ CHX gel	Yes	No	MTA
Shimizu et al, 2013	2,5% NaOCl	Ca(OH) ₂	Yes	No	MTA
Cehreli et al, 2013	2,5% NaOCl	Ca(OH) ₂	Yes	No	MTA
Mishra et al, 2013	2,5% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	No	No	MTA
Forghani et al, 2013	5,25% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	MTA
Sonmez et al, 2013	5,25% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	MTA
Kottoor et al, 2013	5,25% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	MTA

	Irrigation	Intracanal medicament	Blood clot	Collagen sponge	Coronal barrier
Yang et al, 2013	5,25% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	No	No	GIC
Noy et al, 2013	2,5% NaOCl 2%CHX	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	MTA
Chen et al, 2013	3% NaOCl CHX	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	MTA
Hargreaves et al, 2013	1,5% NaOCl 17%EDTA	Ca(OH) ₂ Metronidazole +Ciprofloxacin	Yes	Collatape	MTA
Jadhav et al, 2013	2,5% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	GIC
Bezgin et al, 2014	2,5% NaOCl 0,12%CHX	Metronidazole, Ciprofloxacin, Cefaclor	No	No	MTA
Becerra et al, 2014	5,25% NaOCl 2% CHX	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	MTA

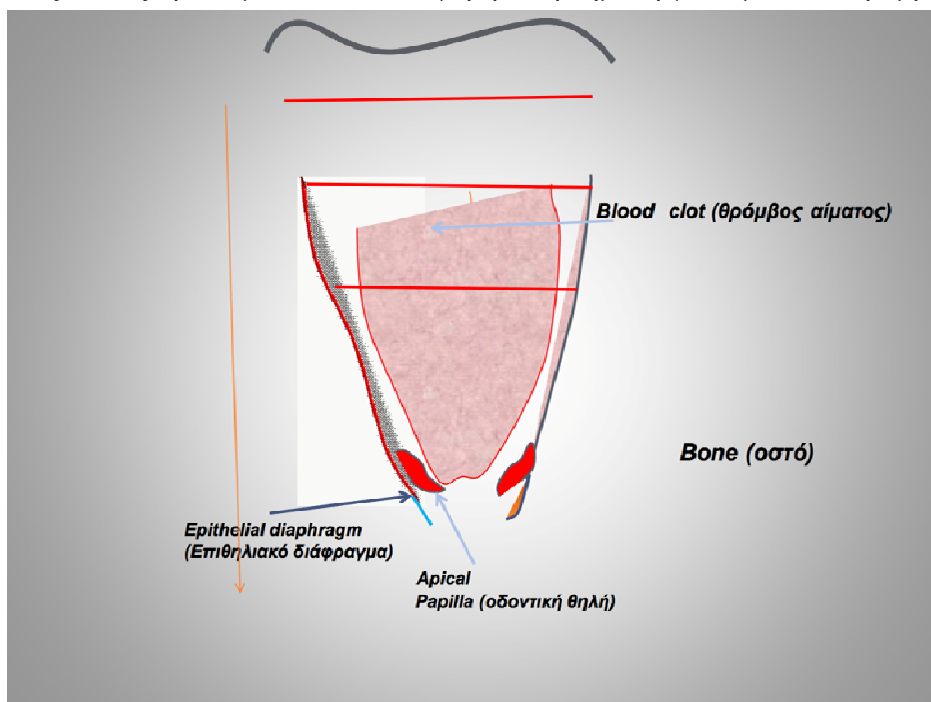
	Irrigation	Intracanal medicament	Blood clot	Collagen sponge	Coronal barrier
Lin et al, 2014	5,25% NaOCl	Ca(OH) ₂ Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	MTA
Nagy et al, 2014	2,5% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Doxycycline	Yes	No/ Gelatin with bFGFs	MTA
Kahl et al, 2014	1%NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Amoxicillin	Yes	No	MTA
Jadhav et al, 2014	2,5% NaOCl	Metronidazole, Ciprofloxacin, Minocycline	Yes	No	GIC
Amit et al, 2014	5,25% NaOCl 17%EDTA	Metronidazole, Ciprofloxacin, Cefaclor	Yes	No	MTA

Πίνακας 2. Εφαρμοζόμενα πρωτόκολλα αναγεννητικής Ενδοδοντικής θεραπείας σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία

Από αυτόν τον πίνακα συμπεραίνεται πως δεν υπάρχει ένα σαφές πρωτόκολλο που εφαρμόζεται σε κλινικά περιστατικά Αναγεννητικής Ενδοδοντολογίας. Συνολικά φαίνεται ότι στην πλειοψηφία των περιστατικών χρησιμοποιήθηκε το υποχλωριώδες νάτριο ως υγρό διακλυσμών σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ως φάρμακο εγκλεισμού χρησιμοποιήθηκε μείγμα αντιβιοτικών και σε ένα μέρος των περιστατικών υδροξείδιο του ασβεστίου. Σχεδόν σε όλα τα περιστατικά χρησιμοποιήθηκε MTA ως έμφραξη του μυλικού μέρους της ρίζας. Διαφοροποιήσεις παρατηρούνται επίσης ως προς την δημιουργία αιματικού θρόμβου και ως προς τη ποιότητα του αλλά και ως προς τις διαστάσεις του (εικόνα 6,7). Πρέπει να απαντηθούν ερωτήματα όπως ο χρόνος αναμονής για το σχηματισμό του και το ποια είναι η πρόπουσα πυκνότητα του. Επίσης δεν είναι απολύτως ξεκαθαρισμένο το σε τι ύψος μέσα στο ριζικό σωλήνα θα διαμορφωθεί ή ποια είναι η διάμετρος του ριζικού σωλήνα στο ακρορρίζιο που επιτρέπει τη δημιουργία αλλά και την επικοινωνία του θρόμβου με του περιακρορριζικούς ιστούς⁷⁰.



Εικόνα 6. Σχεδιαγραμματική αναπαράσταση του εύρους του ριζικού σωλήνα σε σχέση με παρακείμενους ιστούς προκειμένου να τελεσφορήσει η δημιουργία αιματικού θρόμβου



Εικόνα 7. Σχεδιαγραμματική αναπαράσταση του πιθανού ύψους του αιματικού θρόμβου στο ριζικό σωλήνα σε σχέση με παρακείμενους ιστούς από τους οποίους μπορούν να ελκυσθούν βλαστικά κύτταρα.

3. Τα φάρμακα στο χώρο της Αναγεννητικής Ενδοδοντολογίας

Σημαντικότερη προϋπόθεση για την επιτυχία των αναγεννητικών τεχνικών είναι η επίτευξη ασηψίας στο περιβάλλον του ριζικού σωλήνα. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην Αναγεννητική Ενδοδοντολογία αφορούν:

A) Φάρμακα που διαμορφώνουν ή διαφοροποιούν τα ικρίωματα. Ως ικρίωματα θεωρούνται και τα τοιχώματα της οδοντίνης. Τέτοια φάρμακα είναι το EDTA, το κιτρικό οξύ και το MTAD.

B) Φάρμακα που αυξάνουν τη δραστηριοποίηση ή και τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων, όπως οι διάφοροι αυξητικοί παράγοντες (TGFβ1, TGFβ2, BMP2, BMP4, BMP7).

Γ) Φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την απολύμανση - αποστείρωση της πολφικής κοιλότητας μετά από την ελάχιστη δυνατή μηχανική παρέμβαση. Στην τελευταία κατηγορία υπάγονται τα διάφορα σχήματα αντιβιοτικών που έχουν προταθεί κατά καιρούς και για τα οποία γίνεται αναφορά παρακάτω, όπως και το υδροξείδιο του ασβεστίου.

i) Αντιβιοτικά

Οι Sato και συν. μελέτησαν τη διεισδυτικότητα και αντιμικροβιακή δράση ενός

μείγματος τριών αντιβιοτικών το οποίο παρασκεύασαν από ανάμειξη ίσων ποσοτήτων μετρονιδαζόλης, μινοκυκλίνης και σιπροφλοξασίνης σε διάλυμα δις αποσταγμένου νερού. Χρησιμοποίησαν μετρονιδαζόλη, η οποία είναι δραστική κατά των αναερόβιων μικροβιακών στελεχών, με στόχο την εκρίζωση των αναερόβιων μικροβίων που είναι εγκατεστημένα βαθιά στα οδοντινοσωληνάκια και ανθίστανται της χημικομηχανικής επεξεργασίας. Επίσης, πρόσθεσαν μινοκυκλίνη και σιπροφλοξασίνη, λόγω του περιορισμένου αντιμικροβιακού φάσματος της μετρονιδαζόλης.

Το μείγμα των αντιβιοτικών παρουσίασε αποτελεσματική διείσδυση στα οδοντινοσωληνάκια και εξουδετέρωση των μικροβίων που αποικίζουν σε αυτά. Ωστόσο, προβληματίσε η πιθανή δυσχρωμία του δοντιού λόγω της μινοκυκλίνης, γι' αυτό και προτάθηκε από την παραπάνω ερευνητική ομάδα η αντικατάστασή της από αμοξυκιλλίνη ή κεφακλόρη (κεφαλοσπορίνη 2ης γενιάς)⁶¹. Σε άλλη πρόσφατη έρευνα το τριπλό, αλλά και το διπλό αντιβιοτικό, χωρίς τη μινοκυκλίνη, φάνηκαν αποτελεσματικά στην εξουδετέρωση μικροβιακών στελεχών και βιοϋμενίων *E. faecalis* και *P. gingivalis*⁶². Το μείγμα μετρονιδαζόλης - μινοκυκλίνης - σιπροφλοξασίνης έγινε τα επόμενα χρόνια και παραμένει το δημοφιλέστερο φάρμακο εγκλεισμού στο πεδίο της Αναγεννητικής Ενδοδοντολογίας. Συγκεκριμένα, το παραπάνω μείγμα χρησιμοποιείται ως αντισηπτικό σε περιπτώσεις δοντιών με νεκρό πολφό και αδιάπλαστο ακρορρίζιο

με σκοπό την επαναγγείωση του ριζικού σωλήνα, τη συνέχιση της διάπλαση της ρίζας, την αύξηση του πάχους των τοιχωμάτων της και την ολοκλήρωση της μορφοποίησης της ακρορριζικής περιοχής. Το μείγμα (20mg από κάθε αντιβιοτικό/ ml) εισάγεται στο ριζικό σωλήνα με Lentulo, όπου και παραμένει για τουλάχιστον 3-4 εβδομάδες.

Οι Iwaya και συν. χρησιμοποίησαν το παραπάνω μείγμα ως αντισηπτικό σε δόντι με αδιάπλαστο ακρορρίζιο και χρόνια φατνιακό απόστημα (ύπαρξη συριγγίου) ανήλικου ασθενή και διαπίστωσαν σε επανεξέταση μετά από 30 μήνες, συνέχιση της διάπλασης της ρίζας του δοντιού, αύξηση του πάχους των τοιχωμάτων της, καθώς και θετική αντίδραση του πολφού στην ηλεκτρική δοκιμασία⁵⁸.

Σε πρόσφατη αναφορά περιστατικού, οι Thomson και Kahler εφάρμοσαν το μείγμα του τριπλού αντιβιοτικού μετρονιδαζόλης – σιπροφλοξασίνης – αμοξυκιλίνης, σε περίπτωση χρόνιου φατνιακού αποστήματος σε δόντι με αδιάπλαστο ακρορρίζιο. Μετά από 18 μήνες διαπίστωσαν ολοκλήρωση της διάπλασης της ρίζας του δοντιού και θετική αντίδραση του πολφού στην ηλεκτρική δοκιμασία⁷¹.

Στα μειονεκτήματα του τριπλού μείγματος αντιβιοτικών περιλαμβάνεται η πιθανή ανάπτυξη ανθεκτικών μικροβιακών στελεχών και η πρόκληση δυσχρωμιών, όταν εφαρμόζεται ο συνδυασμός μετρονιδαζόλης - μινοκυκλίνης –

σιπροφλοξασίνης, που αποδίδεται στην τετρακυκλίνη^{72,73}. Επιπλέον, όταν το μείγμα περιλαμβάνει αμοξυκιλλίνη, αντένδειξη αποτελεί η ύπαρξη ιστορικού αλλεργικής ευαισθησίας του ασθενούς στην πενικιλίνη. Τέλος προβληματισμοί έχουν τεθεί όσον αφορά τη σχέση συγκέντρωσης - τοξικότητας του μείγματος και τα βλαστικά κύτταρα⁷⁴.

ii) Υδροξείδιο του ασβεστίου – Ca(OH)_2

Στο χώρο της Ενδοδοντολογίας εισήχθη από τον Hermann το 1920. Στη θερμοκρασία του σώματος και σε υδατικό περιβάλλον διασπάται σε ιόντα ασβεστίου και υδροξυλίου δημιουργώντας ένα ιδιαίτερος αλκαλικό ($\text{pH} > 12$) και τοξικό για τα μικρόβια περιβάλλον. Σύμφωνα με μελέτη, το pH του υδροξειδίου του ασβεστίου διατηρείται σε αυτές τις τιμές για 4 εβδομάδες, την 6η εβδομάδα μειώνεται στο 10, ενώ την 8η παραμένει σε αρκετά υψηλές τιμές της τάξης του 9,6. Τα κατιόντα υδροξυλίου καταστρέφουν τα φωσφολιπίδια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των βακτηρίων, διασπούν τους ιοντικούς δεσμούς των πρωτεϊνών των βακτηρίων ή παρεμβαίνουν στο βακτηριακό DNA επιφέροντας κυτταρικό θάνατο. Σε επαφή με τον αέρα αδρανοποιείται σχηματίζοντας ανθρακικό ασβέστιο (CaCO_3).

Έχει χρησιμοποιηθεί έως σήμερα στην πολφοτομή νεογιλών δοντιών χωρίς όμως ιδιαίτερη επιτυχία, στην πολφοτομή δοντιών με αδιάπλαστο ακρορρίζιο (Frank

1960), στην μακρόχρονη τεχνική της ακρορριζοποίησης σε δόντια με αδιάπλαστο ακρορρίζιο και νεκρό πολφό και ως φάρμακο εγκλεισμού στους ριζικούς σωλήνες μεταξύ των συνεδριών της ενδοδοντικής θεραπείας για περαιτέρω μείωση του μικροβιακού φορτίου. Σήμερα το υδροξείδιο του ασβεστίου μαζί με τη CHX 2% σε μορφή γέλης αποτελούν τα δημοφιλέστερα φάρμακα εγκλεισμού. Το CaOH_2 κυκλοφορεί, είτε σε μορφή πάστας έτοιμη προς χρήση, είτε σε καθαρή σκόνη η οποία απαιτεί ανάμειξη με δις απεσταγμένο νερό ή φυσιολογικό ορρό σε αναλογία σκόνης / υγρού 6 : 4. Η εισαγωγή του φαρμάκου στο ριζικό σωλήνα γίνεται με Lentulo μεγέθους ένα νούμερο μικρότερο από το κύριο ακρορριζικό εργαλείο. Κυκλοφορούν επίσης και κώνοι χάρτου εμποτισμένοι με υδροξείδιο του ασβεστίου με αμφίβολη αποτελεσματικότητα .

Οι βασικότερες ιδιότητες του είναι το υψηλό pH, ο ικανοποιητικός βαθμός ιονισμού, η διαλυτική δράση του οργανικού υποστρώματος, η δέσμευση CO_2 και η υγροσκοπικότητα. Το υδροξείδιο του ασβεστίου εμφανίζει ευρεία, ισχυρή και παρατεταμένη αντιμικροβιακή δράση, αντιφλεγμονώδη δράση, καθώς και οστεογεννητική με έμμεσο τρόπο δράση. Σε κλασσική μελέτη μετά το πέρας της χημικομηχανικής επεξεργασίας με χρήση 1,25% NaOCl το ποσοστό των ριζικών σωλήνων που βρέθηκαν ελεύθεροι μικροβίων ήταν 61,9%. Μετά τη χρήση υδροξειδίου του ασβεστίου εντός των ριζικών σωλήνων για τουλάχιστον μία εβδομάδα το αντίστοιχο ποσοστό ανερχόταν στο 92,5%. Ο *E. faecalis* αποτελεί

μικροβιακό στέλεχος με αυξημένη ανθεκτικότητα στο αλκαλικό pH του υδροξειδίου του ασβεστίου. Σχετική μελέτη έκανε λόγο για υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση της CHX 2% έναντι του $\text{Ca}(\text{OH})_2$ αναμεμειγμένο, είτε με ορρό, είτε με CHX κατά του εντερόκοκκου *E. faecalis*. Ωστόσο, δε διαπιστώνεται στη βιβλιογραφία απόλυτη συμφωνία για το ποιο αντισηπτικό εκ των $\text{Ca}(\text{OH})_2$ και CHX παρουσιάζει ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση, διότι υπάρχουν μελέτες που εμφανίζουν το υδροξείδιο του ασβεστίου ισχυρότερο της CHX, ενώ σε άλλες δεν εμφανίζεται σημαντική διαφορά στην αντιμικροβιακή δράση μεταξύ των δύο αντισηπτικών.

Η καθαρή σκόνη υδροξειδίου του ασβεστίου έχει αναμειχθεί και με άλλα φάρμακα, όπως καμφορούχο παραμονοχλωροφαινόλη (CPMC), 2% χλωρεξιδίνη, διάλυμα καλίου σε ιωδιούχο κάλιο (IKI), υποχλωριώδες νάτριο με τα αποτελέσματα να ποικίλουν σχετικά με την αύξηση της αντιμικροβιακής δράσης του συνδυασμού τους. Αντίθετα, έχει υποστηριχθεί ότι η ανάμειξη σκόνης $\text{Ca}(\text{OH})_2$ με CPMC έχει αρνητική επίδραση στο τελικό αλκαλικό pH του. Συνεπώς, το δις αποσταγμένο νερό και ο φυσιολογικός ορρός παραμένουν τα πιο συνήθη μέσα για την ανάμειξη της σκόνης $\text{Ca}(\text{OH})_2$ προκειμένου να σχηματισθεί πάστα αυτού.

Το υδροξείδιο του ασβεστίου είναι αντισηπτικό μακράς διάρκειας δράσης και απαιτεί, σε αντίθεση με άλλα φάρμακα εγκλεισμού, παραμονή τουλάχιστον μίας

εβδομάδας στο ριζικό σωλήνα για την πλήρη εκδήλωση της αντιμικροβιακής του δράσης. Το στοιχείο αυτό αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα στις περιπτώσεις που για οποιοδήποτε λόγο η επόμενη συνεδρία δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα^{75,76,77}.

Ένα πρόβλημα που εγείρεται σχετικά με τη χρήση των φαρμάκων εγκλεισμού αφορά την απομάκρυνσή τους. Σχετικά με το υδροξείδιο του ασβεστίου έχουν δημοσιευθεί πολλές μελέτες, οι οποίες αποδεικνύουν ότι η πλήρης αφαίρεσή του, ειδικά στο μέσο και ακρορριζικό τριτημόριο είναι πρακτικά αδύνατη, ανεξάρτητα της μεθόδου αφαίρεσης^{78,79,80} (εικόνα 8). Πρόσφατα σε μελέτη φάνηκε πως και το μείγμα τριπλού αντιβιοτικού αφήνει κατάλοιπα στα τοιχώματα του ριζικού σωλήνα⁸¹. Αυτά τα υπολείμματα των φαρμάκων εγκλεισμού είναι μέχρι στιγμής άγνωστο τι επίδραση μπορεί να έχουν στα βλαστικά κύτταρα που αποικίζουν τον ριζικό σωλήνα, στους ιστούς που σχηματίζονται και στην τελική έκβαση της θεραπείας.



Εικόνα 8. Υπολείμματα υδροξειδίου του ασβεστίου μέσα σε ριζικό σωλήνα (Από την εργασία Kontakiotis EG, Tsatsoulis IN, Papanakou SI, Tzanetakakis GN Effect of 2% chlorhexidine gel mixed with calcium hydroxide as an intracanal medication on sealing ability of permanent root canal filling: a 6-month follow-up. J Endod. 2008 Jul;34(7):866-70)

Ειδικό μέρος

Εισαγωγή

Με τον όρο Αναγεννητική Ενδοδοντολογία ορίζεται το σύνολο των θεραπευτικών ενεργειών οι οποίες βασιζόμενες σε βιολογικές ιδιότητες και διεργασίες έχουν ως σκοπό την αποκατάσταση κατεστραμμένων ή εκλειπόντων δομών του δοντιού και ειδικότερα της οδοντίνης, της ρίζας και του συμπλέγματος πολφού-οδοντίνης.

Οι αρχές της Αναγεννητικής Ενδοδοντολογίας βρίσκουν σήμερα κλινική εφαρμογή σε δόντια με πολφική νέκρωση και αδιάπλαστο ακρορρίζιο, όπου σκοπός της θεραπείας εκτός της αντιμετώπισης της φλεγμονής είναι η ολοκλήρωση της διάπλασης της ρίζας και η αποκατάσταση της πολφικής λειτουργίας⁴.

Τα τελευταία χρόνια έχει δημοσιευτεί πλήθος περιστατικών, όπου φαίνεται πως η αντιμετώπιση της ακρορριζικής αλλοίωσης οδοντικής αιτιολογίας σε δόντια με αδιάπλαστο ακρορρίζιο μπορεί να οδηγήσει στη συνέχιση της διάπλασης της ρίζας και στην πάχυνση των τοιχωμάτων του ριζικού σωλήνα. Η διαφορετική μεθοδολογία που έχει ακολουθηθεί σε αυτά τα περιστατικά, όπως επίσης και η έλλειψη τυχαιοποιημένων κλινικών ερευνών δεν καθιστά δυνατό τον ορισμό ενός προβλέψιμου πρωτοκόλλου. Η συνεχής έρευνα που διεξάγεται έχει ως σκοπό την πλήρη κατανόηση των βιολογικών διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα με σκοπό

την επίτευξη προβλεψιμότητας στην επιτυχία θεραπειών βασιζόμενες στην Αναγεννητική Ενδοδοντολογία⁷⁰.

Η παρούσα έρευνα έχει ως σκοπό να εξετάσει σε συνθήκες *in vitro* την επίδραση των υπολειμμάτων των δύο πιο διαδεδομένων φαρμάκων εγκλεισμού που χρησιμοποιούνται στην Αναγεννητική Ενδοδοντολογία, της πάστας τριπλού αντιβιοτικού και του υδροξειδίου του ασβεστίου, στην επιβίωση βλαστικών κυττάρων οδοντικού πολφού νεογιλών δοντιών.

Υλικά και Μέθοδος

Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 9 μονόρριζα δόντια με ευρύ ριζικό σωλήνα και μήκος ρίζας τουλάχιστον 10 χιλιοστά. Αφού έγινε αποκοπή της μύλης και διαμόρφωση όλων των δειγμάτων σε μήκος 10 χιλιοστών, χαράχθηκε αύλακα με δίσκο κοπής κατά τον επιμήκη άξονα του δοντιού χωρίς να εισέρχεται στο ριζικό σωλήνα για να διευκολυνθεί ο διαχωρισμός της ρίζας στη συνέχεια. Έπειτα πραγματοποιήθηκε χημικομηχανική επεξεργασία με τεχνική *stepback* χρησιμοποιώντας ρίνες K χειρός (K files, Maillefer, Switzerland) για το ακρορριζικό τριτημόριο και Gates (Gates drills, Mani co., Japan) για το μέσο και αυχενικό. Η επεξεργασία ολοκληρώθηκε με κύριο ακρορριζικό εργαλείο το No 60 και ολοκληρώθηκε με κωνική διεύρυνση με Gates No 2,3 και 4. Σε κάθε ριζικό σωλήνα πραγματοποιήθηκαν διακλυσμοί με υποχλωριώδες νάτριο συγκέντρωσης

2,5% συνολικού όγκου 20ml. Έπειτα οι ριζικοί σωλήνες στεγνώθηκαν με κώνους χάρτου και χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες. Στην πρώτη ομάδα οι ριζικοί σωλήνες έμειναν κενοί και αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Στη δεύτερη ομάδα τοποθετήθηκε πάστα τριπλού αντιβιοτικού μετρονιδαζόλης, μινοκυκλίνης και σιπροφλοξασίνης σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Hoshino⁶². Η τοποθέτηση έγινε με τη χρήση εργαλείου lentulo. Στην τρίτη ομάδα τοποθετήθηκε πάστα καθαρού υδροξειδίου του ασβεστίου αναμεμειγμένου με φυσιολογικό ορρό σε αναλογία 6:4 επίσης με χρήση lentulo. Τα δείγματα παρέμειναν με το φάρμακο εγκλεισμού για μια εβδομάδα τυλιγμένα με γάζα εμποτισμένη σε φυσιολογικό ορρό, σε κλειστό δοχείο, μέσα σε επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του φαρμάκου εγκλεισμού από τις πειραματικές ομάδες με διακλυσμούς υποχλωριώδους νατρίου συγκέντρωσης 2,5% συνολικού όγκου 30ml. Τελική έκπλυση έγινε με 10 ml φυσιολογικού ορρού.

Μετά την απομάκρυνση των φαρμάκων οι ριζικοί σωλήνες στεγνώθηκαν και οι ρίζες διχοτομήθηκαν κατά τον επιμήκη άξονα με τη χρήση σμίλης η οποία τοποθετήθηκε στην αύλακα που είχε δημιουργηθεί αρχικά. Από κάθε ρίζα προέκυψαν δυο δείγματα τα οποία θα έπαιζαν το ρόλο της «δεξαμενής» μέσα στην οποία θα τοποθετούνταν τα βλαστικά κύτταρα. Έτσι από τα 9 δόντια προέκυψαν 18 δείγματα 6 για κάθε ομάδα.

Καλλιέργεια κυττάρων

Η προμήθεια των βλαστικών κυττάρων οδοντικού πολφού (SHEDs) έγινε από την ProCell, Βιοτεχνολογικές Εφαρμογές, SA (Αθήνα, Ελλάδα). Αφού αποψύχθηκαν μεταφέρθηκαν αμέσως και καλλιεργήθηκαν σε Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, Glasgow, UK), στους 37°C, σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας και συγκέντρωσης CO₂. Το μέσο καλλιέργειας συμπληρώθηκε με πυρουβικό νάτριο, στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη και L-γλουταμίνη και ολοκληρώθηκε με 10% βόειο εμβρυϊκό ορό απενεργοποιημένο με θέρμανση (FBS, Biochrom, Cambridge, UK). Οι καλλιέργειες των SHEDs που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα βρίσκονταν στο 3⁰-6⁰ πέρασμα (3rd-6th passage). Για την καταμέτρηση του αρχικού αριθμού των κυττάρων, τα κύτταρα αναδιαλύθηκαν σε διάλυμα TrypanBlue (Gibco, Glasgow, UK) και εφαρμόστηκε κλασσική αιματοκυτταρομετρία (Neubauer) για να προσδιορισθεί ο πληθυσμός των κυττάρων και η βιωσιμότητά τους. Το αιμοκυτταρόμετρο, ή αλλιώς γνωστό και ως Neubauer, είναι μια ειδικά κατασκευασμένη αντικειμενοφόρος με τη δική της καλυπτρίδα που έχει κατασκευαστεί για την καταμέτρηση των στερεών συστατικών του αίματος (ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια) σε ορισμένο όγκο αίματος. Το όργανο όμως αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την καταμέτρηση άλλων μικροσκοπικών δομών ή κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα, όπως για παράδειγμα τα κύτταρα μιας κυτταροκαλλιέργειας. Σε

καθένα από τα δείγματα τοποθετήθηκαν 10^5 κύτταρα και διατηρήθηκαν σε πλήρες μέσο κυτταροκαλλιέργειας για επτά ημέρες με την επιφάνεια του ριζικού σωλήνα προς τα πάνω. Μετά την παρέλευση μιας εβδομάδας τα δείγματα απομακρύνθηκαν με τη χρήση λαβίδας και τοποθετήθηκαν σε στείρες πλάκες 12 θέσεων (12 well plate) προκειμένου να καταμετρηθεί ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων στην επιφάνεια του ριζικού σωλήνα και να αξιολογηθούν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους.

Χρώση του κυτταρικού σκελετού και του πυρήνα

Τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν στα δείγματα μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 4% για 20 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με διάλυμα PBS (phosphate buffered saline) για την απομάκρυνση της περίσσειας παραφορμαλδεΐδης τρεις φορές. Έπειτα πραγματοποιήθηκε επεξεργασία της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα B (0,1% Triton X-100 σε PBS) για 10 λεπτά και με ρυθμιστικό διάλυμα A (0,5% Triton X-100 σε PBS) για άλλα 10 λεπτά. Το συγκεκριμένο βήμα πραγματοποιήθηκε τρεις φορές. Ακολούθησε επώαση σε διάλυμα δέσμευσης μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος (BSA - bovine serum albumin - 0,5% w/v, σε διάλυμα PBS 1x) για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Εν συνεχεία προστέθηκε διάλυμα Phalloidin Rhodamine

(Molecular Probes), για χρώση της ακτίνης για 30 λεπτά. Για την παρατήρηση των ακέραιων πυρήνων χρησιμοποιήθηκε χρώση 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).⁶⁷

Παρατήρηση στο μικροσκόπιο

Τα κύτταρα των δειγμάτων παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Οι εικόνες φθορισμού λήφθηκαν με το συνεστιακό μικροσκόπιο Zeiss LSM710 (Zeiss, Thornwood, NY microscope). Στη συνέχεια αναλύθηκαν με λογισμικό Zeiss.

Η εξέταση του κάθε δείγματος έγινε με το συνεστιακό μικροσκόπιο σε όλη την επιφάνεια του κάθε εξεταζόμενου υλικού. Καταμέτρηση των κυττάρων έγινε με λογισμικό image J (3D) αλλά και χειροκίνητα (manual). Τέλος υπολογίστηκε η συνολική επιφάνεια του κάθε δείγματος.

Στατιστική Μεθοδολογία

Για τη διερεύνηση τυχόν στατιστικά σημαντικών διαφορών ως προς τις μέσες τιμές του κλάσματος αριθμού κυττάρων ανά μονάδα επιφάνειας (mm^2) (μη κανονική κατανομή), μεταξύ των πειραματικών ομάδων (αντιβιοτικό, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, ελέγχου) και ανά μέθοδο (manual και 3D – πίνακες A και B),

πραγματοποιήθηκαν οι στατιστικές δοκιμασίες Kruskal Wallis και Mann-Whitney U. Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε το $p < 0,05$ και όλες αναλύσεις έγιναν με το πρόγραμμα SPSS IBM, v. 21.

manual	control	antibiotic	Ca(OH) ₂
1	7,6	14,6	19,8
2	8,3	15	14,3
3	7,6	17	19,1
4	12,1	13,3	15,3
5	9,7	12,5	14,7
6	9,3	15,5	16,7

Πίνακας Α. Τιμές του κλάσματος αριθμού κυττάρων ανά μονάδα επιφάνειας (mm²) σε manual καταμέτρηση.

3D	control	antibiotic	Ca(OH) ₂
1	8	16,8	28,7
2	8,5	15,2	14,9
3	7,7	17,1	19,2
4	12,3	13,4	15,3
5	9,9	12,7	14,8
6	9,5	16	16,8

Πίνακας Β . Τιμές του κλάσματος αριθμού κυττάρων ανά μονάδα επιφάνειας (mm²) σε καταμέτρηση με λογισμικό.

Αποτελέσματα:

Όπως παρουσιάζονται στους πίνακες 1 και 2, και με τις δύο μεθόδους καταγραφής (manual και 3D), οι ομάδες «αντιβιοτικό» και «Ca(OH)₂» παρουσίασαν στατιστικά σημαντικό υψηλότερο αριθμό κυττάρων σε σχέση με την ομάδα «ελέγχου». Από την άλλη μεριά, και με τις δύο μεθόδους, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων «αντιβιοτικό» και «Ca(OH)₂».

Σημειώνεται, πως μεταξύ των μέσων τιμών των κυττάρων κατά μέθοδο(manual και 3D) ανά πειραματική ομάδα, δεν παρατηρήθηκαν επίσης σημαντικές διαφορές στις μετρήσεις (πχ πίνακας1, για την ομάδα ελέγχου: 9,1 (manual) vs. 9,3 (3D),

μη στατιστική διαφορά κατά Mann Whintey U test).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1		Ομάδα	
Μέθοδος	control	Antibiotic	Ca(OH) ₂
Manual	9,1 ±1,71	14,65 ±1,6	16,65 ±2,33
Kruskal Wallis, p<0,002			
3D	9,3 ±1,7	15,2 ±1,81	18,28 ±5,37
Kruskal Wallis, p<0,003			

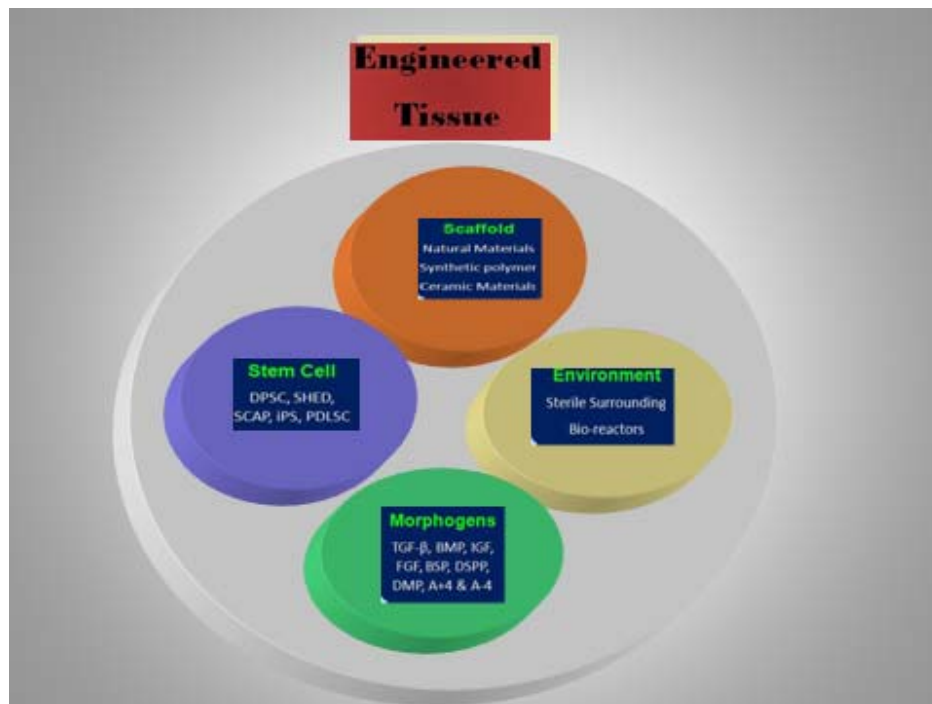
Πίνακας 1. Μέσες τιμές και ±σταθερές αποκλίσεις αριθμού κυττάρων ανά επιφάνεια (cm²) κατά μέθοδο και πειραματική ομάδα

ΠΙΝΑΚΑΣ 2	p		
Manual			
control vs. antibiotic	0,004		
control vs. Ca(OH) ₂	0,004		
antibiotic vs. Ca(OH) ₂	MΣ		
3D			
control vs. antibiotic	0,004		
control vs. Ca(OH) ₂	0,004		
antibiotic vs. Ca(OH) ₂	MΣ		

Πίνακας 2. Σύγκριση όλων των δυνατών διαφορών αριθμού κυττάρων μεταξύ των πειραματικών ομάδων (post hoc analysis) ανά μέθοδο.

Κατά την παρατήρηση αξιολογήθηκαν και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων. Τα κύτταρα τα οποία αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα υπολειμμάτων υδροξειδίου του ασβεστίου εμφανίζονταν στην πλειοψηφία τους με ευδιάκριτους πυρήνες και αποπεπλατυσμένα σε αντίθεση με τις υπόλοιπες ομάδες όπου επικρατούσαν στρόγγυλα κύτταρα, χαρακτηριστικά που τα καθιστούν ικανότερα για επιβίωση, περαιτέρω πολλαπλασιασμό και ενδεχομένως διαφοροποίηση.

Συζήτηση



Η εξέλιξη της Ενδοδοντολογίας οδηγεί προς την αναγεννητική Ενδοδοντολογία. Μέχρι και σήμερα η κλασσική ενδοδοντική θεραπεία αντικαθιστά τον προϋπάρχοντα σε ριζικό σωλήνα πολφό με εμφρακτικά υλικά. Η Αναγεννητική Ενδοδοντολογία επιχειρεί να αντικαταστήσει τον προϋπάρχοντα πολφό με ιστό ο οποίος θα είναι σε θέση να ασκεί τις φυσιολογικές του λειτουργίες.

Σε όλες τις περιπτώσεις απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχή έκβαση είναι η διαμόρφωση κατά το δυνατό στείρου μικροβίων ριζικού σωλήνα^{82,83}. Η προσπάθεια αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική για την Αναγεννητική Ενδοδοντολογία αφού θα πρέπει να αντιμετωπιστεί και η εμμένουσα μικροβιακή χλωρίδα. Η τελευταία στην κλασσική ενδοδοντική θεραπεία αντιμετωπίζεται με

την ερμητική έμφραξη του ριζικού σωλήνα⁸⁴.

Σε περιστατικά της Αναγεννητικής Ενδοδοντολογίας η επίτευξη στείρων συνθηκών στο ριζικό σωλήνα αφορά στη χρήση ισχυρών αντιμικροβιακών ουσιών που διαθέτουν ταυτόχρονα την ελάχιστη δυνατή κυτταροτοξικότητα. Τούτο διότι απαιτείται όχι μόνο στείρο περιβάλλον αλλά και η επιβίωση των μεταφερομένων βλαστικών και μη κυττάρων στο ριζικό σωλήνα.

Τα αντισηπτικά δεν αναγνωρίζουν το κύτταρο στόχο. Τούτο αποτρέπει από τη χρήση ισχυρών αντισηπτικών. Τα αντιβιοτικά επειδή αναγνωρίζουν το κύτταρο στόχο, δηλαδή το μικρόβιο, ενώ χρησιμοποιήθηκαν και στο παρελθόν, βρήκαν ιδιαίτερη χρήση σήμερα στην Αναγεννητική Ενδοδοντολογία.

Το πρόβλημα με τη χρήση αντιβιοτικών στην ενδοδοντική θεραπεία ανάγεται: 1) στην ανάπτυξη αντοχής, 2) στην εμφάνιση αλλεργικών αντιδράσεων και 3) στον υπολογισμό της δοσολογίας, την επιλογή του είδους και των εκδόχων, κλπ.

Είναι γνωστό βέβαια ότι έχει ευρύτατα χρησιμοποιηθεί και το $\text{Ca}(\text{OH})_2$ σαν αντισηπτικό ριζικών σωλήνων λόγω των δράσεων του, απόρροια των ιδιοτήτων του. Από μελέτες, αλλά και από δικά μας πιλοτικά πειράματα, έχει γίνει γνωστό ότι η πλήρης αφαίρεσή του $\text{Ca}(\text{OH})_2$, όπως επίσης και των αντιβιοτικών από το ριζικό σωλήνα, παρά τις προσπάθειες δεν είναι εφικτή. Παράλληλα είναι άγνωστο αν οι παραμένουσες ποσότητες αντιβιοτικών είναι σε συγκεντρώσεις τέτοιες που

να καθιστούν το φάρμακο, φαρμάκι^{78,79,80,81}.

Με βάση αυτόν τον προβληματισμό θέσαμε σαν σκοπό αυτής της έρευνας να μελετήσουμε την επιβίωση και ανάπτυξη βλαστικών κυττάρων σε ένα τέτοιο υπόστρωμα με υπολείμματα Ca(OH)_2 και αντιβιοτικών σε σχέση με μάρτυρες.

Τα δόντια που επιλέχθηκαν ήταν μονόριζα για να εξασφαλίσουμε επαρκή πολφική κοιλότητα. Η επεξεργασία τους πραγματοποιήθηκε με την ίδια τεχνική, τον ίδιο όγκο διακλυσμών και δεν χρησιμοποιήθηκαν EDTA ή κιτρικό οξύ, κυρίως γιατί έχει δείχτεί ότι διαμορφώνει το ικρίωμα θετικά για την ανάπτυξη κυττάρων⁸⁵. Εμείς προσπαθήσαμε να μείνουμε κοντά στη συνήθη κλινική πράξη ελάχιστης παρέμβασης.

Η διχοτόμηση έγινε με τεχνική κατά την οποία χαράχτηκε βαθιά αύλακα κατά τον επιμήκη άξονα του δοντιού χωρίς όμως να γίνει είσοδος στο ριζικό σωλήνα και στη συνέχεια διαχωρισμός με μεταλλική σπάθη έτσι ώστε να μην παρασυρθούν τα υπολείμματα.

Χρησιμοποιήθηκε ίδιος αριθμός κυττάρων από την ίδια καλλιέργεια και από την ίδια σειρά πολλαπλασιασμού (passage) ώστε να μην υπάρχει επίδραση στην επιβίωση και την ανάπτυξη.

Ο τρόπος μέτρησης έγινε με τη βοήθεια λογισμικού αλλά και χειροκίνητα για μεγαλύτερη αξιοπιστία.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρουσία του $\text{Ca}(\text{OH})_2$ έχουμε ανάπτυξη κυττάρων. Με τα αντιβιοτικά έχουμε επίσης ανάπτυξη φαίνεται να υστερούν όμως σε σχέση με το υδροξείδιο του ασβεστίου όχι σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στην ποσότητα αλλά με σαφή τρόπο στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των κυττάρων. Τα κύτταρα τα οποία αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα υπολειμμάτων υδροξειδίου του ασβεστίου εμφανίζονταν με ευδιάκριτους πυρήνες και αποπεπλατυσμένα χαρακτηριστικά που τα καθιστούν ικανότερα για επιβίωση, περαιτέρω πολλαπλασιασμό και ενδεχομένως διαφοροποίηση. Τούτο έρχεται σε αντίθεση με την άποψη που επικρατεί στην κλινική πράξη ότι το υδροξείδιο του ασβεστίου θα πρέπει να αποφεύγεται στην Αναγεννητική Ενδοδοντολογία για λόγους πιθανής τοξικότητας στα βλαστικά κύτταρα.

Η πιθανή θετική επίδραση του υδροξειδίου του ασβεστίου μπορεί να οφείλεται στο υψηλό pH που διαμορφώνει, στην επίδραση των ιόντων Ca που απελευθερώνονται και έτσι να αντισταθμίζεται η θεωρητικά τοξική του επίδραση στα κύτταρα. Άλλος ένας πιθανός μηχανισμός που βοηθά την ανάπτυξη κυττάρων είναι η απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων οι οποίοι εμπεριέχονται στην οδοντίνη μέσω της αλκαλικής υδρόλυσης που έχει παρατηρηθεί⁸⁶.

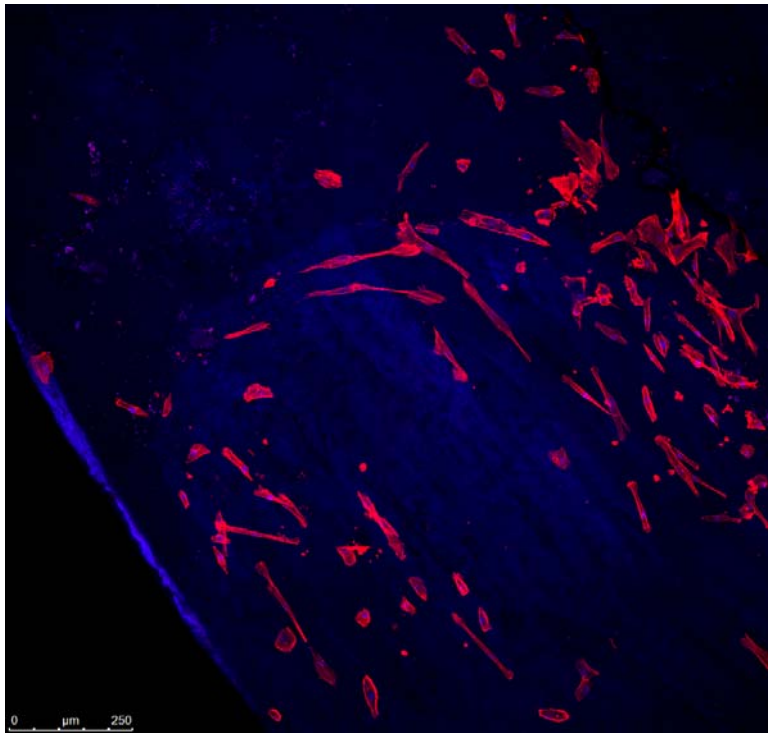
Αντίθετα η δράση των αντιβιοτικών, τουλάχιστο στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, πιθανώς να εμφανίζει τοξική δράση.

Το ερώτημα που προβάλλει συνήθως και αποτέλεσε αντικείμενο ερευνητικών εργασιών είναι η δυνατότητα της πλήρους απομάκρυνσης των φαρμάκων εγκλεισμού. Πίσω όμως από τη δυνατότητα αυτή προβάλλει ένα άλλο ερώτημα. Η αφαίρεση του όποιου φαρμάκου οδηγεί στην προηγουμένως επιτευχθείσα επιφάνεια; Μήπως μετά την αφαίρεση του, παραμένουν υπολείμματα από την ασκηθείσα από αυτά δράση; Μήπως η εγκαταλειπόμενη επιφάνεια είναι τελικά εντελώς διαφορετική σε δομή, σύνθεση και κάλυψη από την προηγουμένως επιτευχθείσα; Π.χ η δράση του υδροξειδίου του ασβεστίου επί των οργανικών υπολλειμμάτων ή του αίματος προφανώς οδηγεί σε παρουσία και εγκατάλειψη ουσιών που πιθανά δεν απομακρύνονται με την ταυτόχρονη απομάκρυνση του υδροξειδίου του ασβεστίου. Ως εκ τούτου μπορεί να υποτεθεί ότι η όποια δράση πάνω στην ανάπτυξη ή εξέλιξη ή διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων οφείλεται στη σωρεία των προηγουμένως αναφερθέντων δράσεων και νεοδιαμορφούμενων καταστάσεων της επιφάνειας της οδοντίνης. Προς τούτοις απαιτούνται περαιτέρω έρευνες που σχέση θα έχουν με τη δομική και χημική σύνθεση της νέας προκύπτουσας οδοντίνης μετά τη δράση των όποιων φαρμάκων.

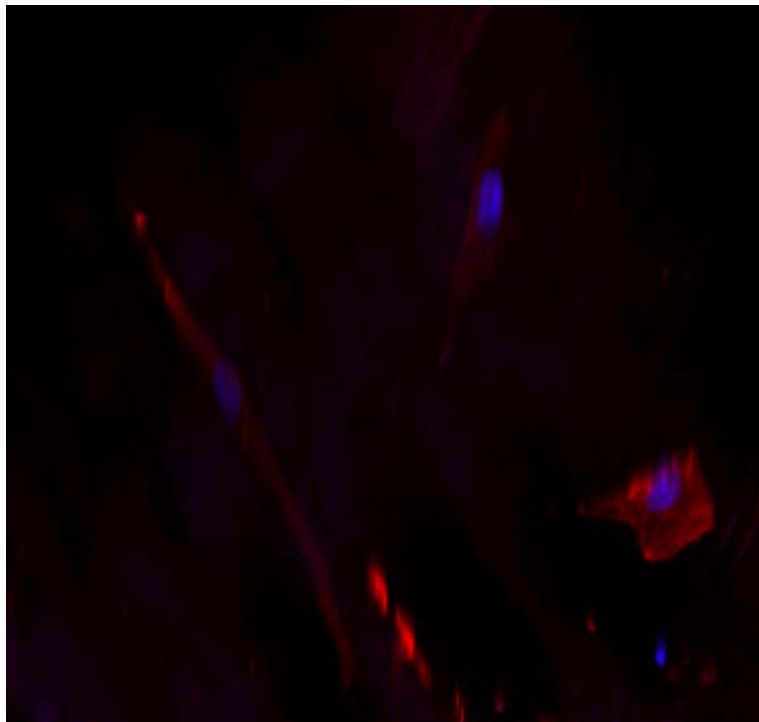
Θέματα που προκύπτουν για το μέλλον είναι η αποσαφήνιση του μηχανισμού με τον οποίο το Ca(OH)_2 έχει θετική επίδραση στην ανάπτυξη κυττάρων, ο υπολογισμός της συγκέντρωσης αντιβιοτικών που δεν είναι κυτταροτοξική αλλά ταυτόχρονα είναι ικανή να αντιμετωπίσει το μικροβιακό φορτίο του ριζικού

σωλήνα και η εξεύρεση νέων μεθόδων απολύμανσης ριζικών σωλήνων.

1A

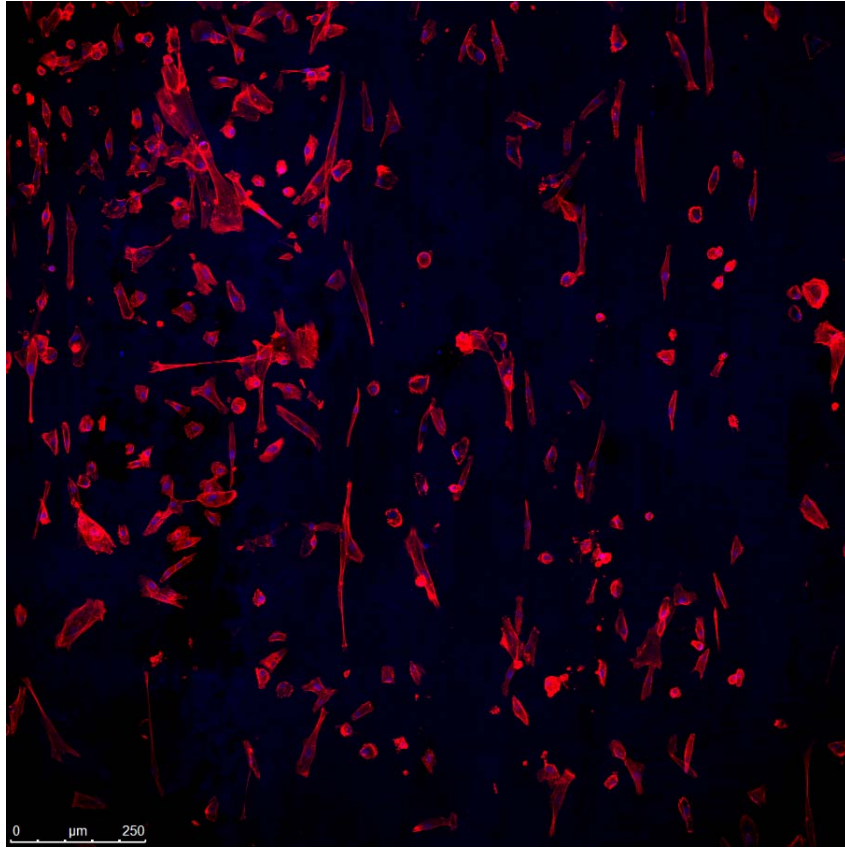


1B

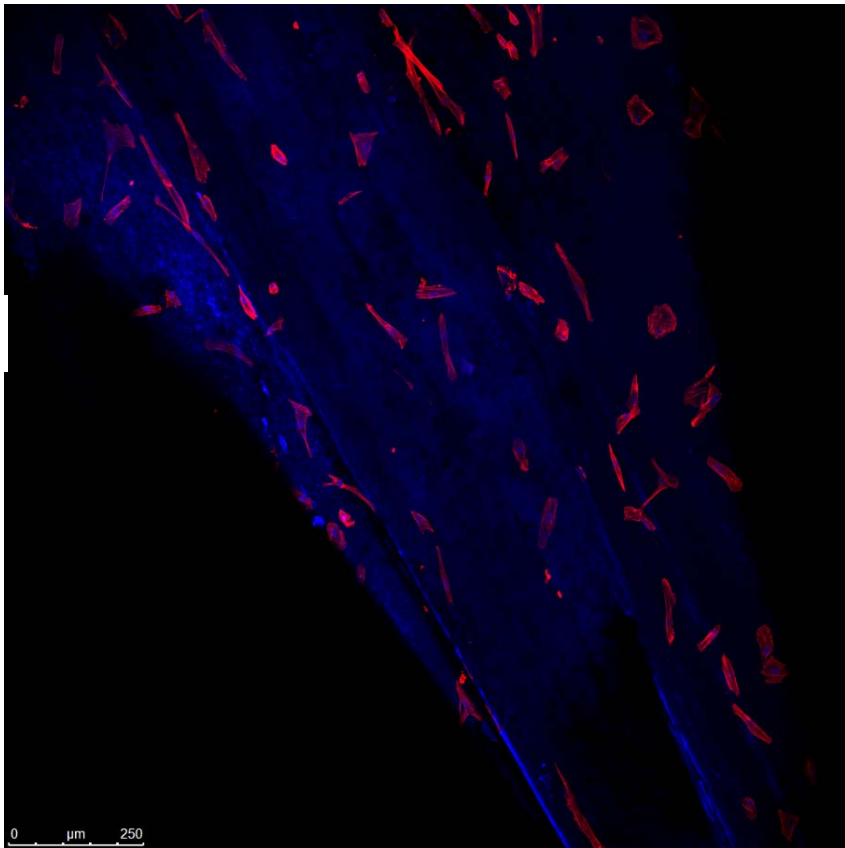


Εικόνα 1 . Η εμφάνιση των βλαστικών κυττάρων με συνεστιακό μικροσκόπιο που αναπτύχθηκαν στην επιφάνεια οδοντίνης ριζικού σωλήνα (μάρτυρας) μεγέθυνση 10X (1A), 20X (1B)

2A

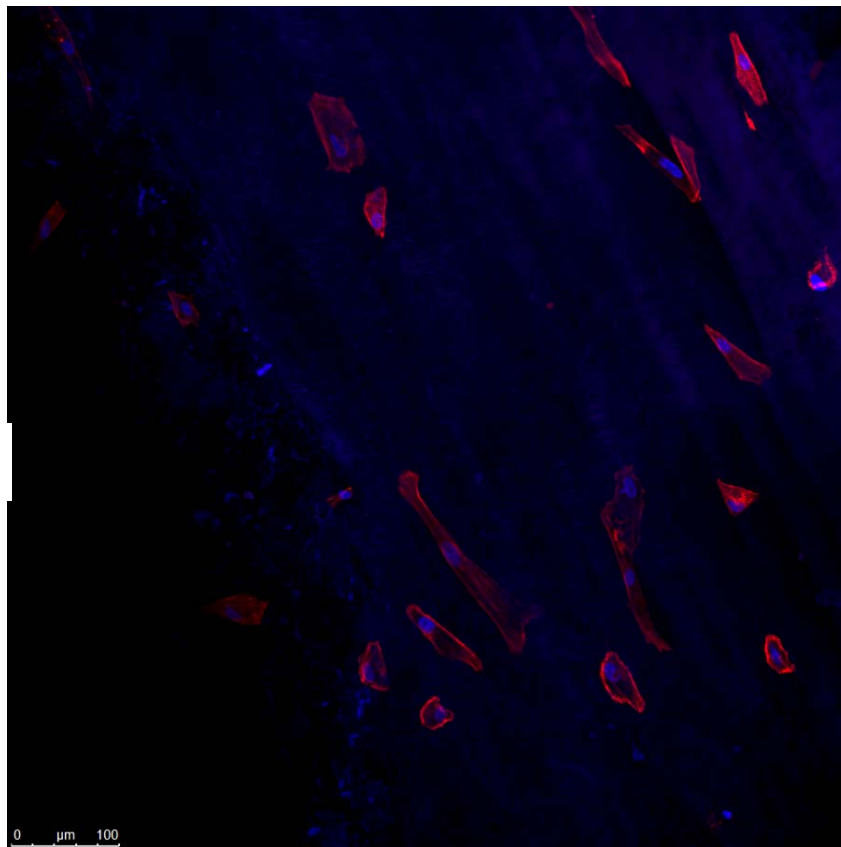


2B

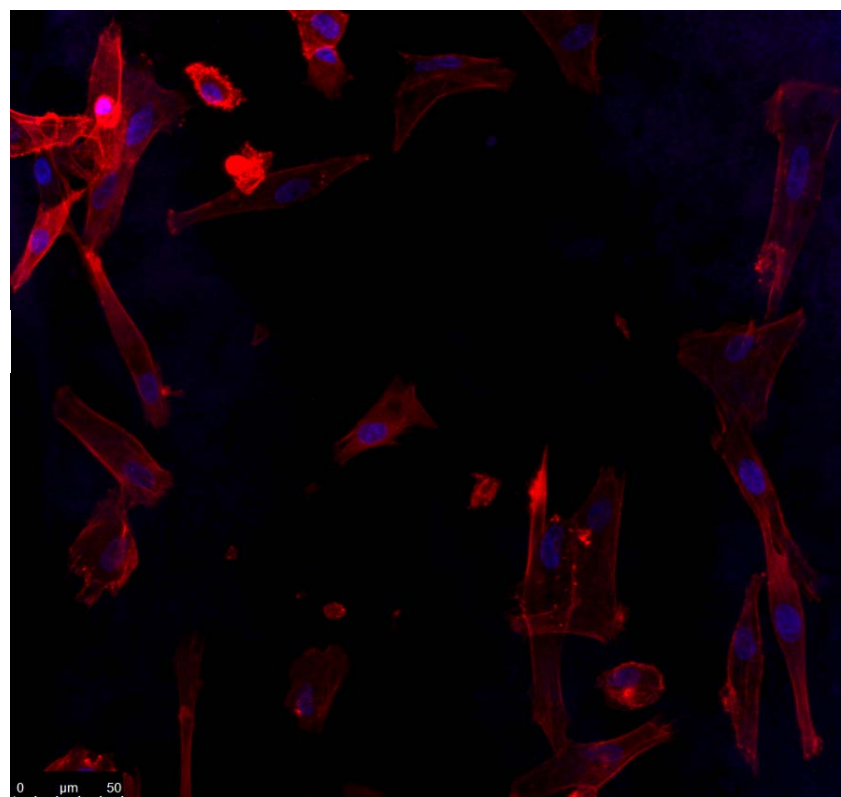


Εικόνα 2. Η εμφάνιση των βλαστικών κυττάρων με συνεστιακό μικροσκόπιο που αναπτύχθηκαν στην επιφάνεια οδοντίνης ριζικού σωλήνα σε έδαφος υπολειμματικού υδροξειδίου του ασβεστίου, μεγέθυνση 10X (2A), 20X (2B).

3A



3B



Εικόνα 3. Η εμφάνιση των βλαστικών κυττάρων με συνεστιακό μικροσκόπιο που αναπτύχθηκαν στην επιφάνεια οδοντίνης ριζικού σωλήνα σε έδαφος υπολειμματικού αντιβιοτικού μεγέθυνση 10X (3A), 20X (3B)

Συμπεράσματα

- Η ανάπτυξη και η προσκόλληση βλαστικών κυττάρων σε επιφάνειες ριζικών σωλήνων (μάρτυρες) που έχουν υποστεί χημικομηχανική επεξεργασία είναι εφικτή.
- Η ανάπτυξη και η προσκόλληση βλαστικών κυττάρων σε επιφάνειες ριζικών σωλήνων που έχουν υποστεί τη δράση υδροξειδίου του ασβεστίου ή τριπλού αντιβιοτικού εκδηλώνεται σε ικανοποιητικό βαθμό σε σχέση με τους μάρτυρες.
- Η ανάπτυξη και η προσκόλληση βλαστικών κυττάρων σε επιφάνειες ριζικών σωλήνων που έχουν υποστεί τη δράση του υδροξειδίου του ασβεστίου είναι ποσοτικά μεγαλύτερη σε σχέση με επιφάνειες που έχουν υποστεί τη δράση του τριπλού αντιβιοτικού, αλλά όχι σε στατιστικά σημαντικό βαθμό.
- Η ανάπτυξη βλαστικών κυττάρων σε επιφάνειες ριζικών σωλήνων που έχουν υποστεί τη δράση του υδροξειδίου του ασβεστίου είναι ποιοτικά καλύτερη σε σχέση με τη ποιότητα των βλαστικών κυττάρων που έχουν αναπτυχθεί σε επιφάνειες που έχουν υποστεί τη δράση του τριπλού αντιβιοτικού ή απλή χημικομηχανική επεξεργασία.

Βιβλιογραφία

1. Προμηθέας Δεσμώτης Αισχύλου. Εκδόσεις Σαββάλας, 2003
2. Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med.* 2008 Jan;3(1):1-5
3. Guillot PV, Cui W, Fisk NM, Polak DJ. Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 2007 Sep-Oct;11(5):935-44
4. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod.* 2007 Apr;33(4):377-90
5. Daar AS, Greenwood HL. A proposed definition of regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007 May-Jun;1(3):179-84
6. Kaplan DL, Moon RT, Vunjak-Novakovic G. It takes a village to grow a tissue. *Nat Biotechnol.* 2005 Oct;23(10):1237-9
7. Atala A. Tissue engineering, stem cells and cloning: current concepts and changing trends. *Expert Opin Biol Ther.* 2005 Jul;5(7):879-92
8. Nyborg H. Healing processes in the pulp on capping; a morphologic study; experiments on surgical lesions of the pulp in dog and man. *Acta Odontol Scand.* 1955;13(suppl. 16):1-130
9. S L Preston, M R Alison, S J Forbes, N C Direkze, R Poulsom, N A Wright. The new stem cell biology: something for everyone. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2003;56:86–96
10. Martin-Rendon E, Watt SM. Transfused exploitation of stem cell plasticity. *Med.* 2003 Dec;13(6):325-49
11. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet.* 1987 May;20(3):263-72
12. Jheon AH, Seidel K, Biehs B, Klein OD. From molecules to mastication: the development and evolution of teeth. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2013 Mar-Apr;2(2):165-82
13. 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 U S A.* 2000 Dec 5;97(25):13625-30
14. Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone.* 2001 Dec;29(6):532-9

15. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002 Aug;81(8):531-5
16. Kim SG, Zhou J, Solomon C, Zheng Y, Suzuki T, Chen M, Song S, Jiang N, Cho S, Mao JJ. Effects of growth factors on dental stem/progenitor cells. *Dent Clin North Am*. 2012 Jul;56(3):563-75
17. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang CY, Shi S, Wang S. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS ONE*. 2006 Dec 20;1:e79
18. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):5807-12
19. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, Smith AJ, Nör JE. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):962-9
20. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004 Jul 10-16;364(9429):149-55.
21. Orciani M, Trubiani O, Vignini A, Mattioli-Belmonte M, Di Primio R, Salvolini E. Nitric oxide production during the osteogenic differentiation of human periodontal ligament mesenchymal stem cells. *Acta Histochem*. 2009;111(1):15-24
22. Yang ZH, Zhang XJ, Dang NN, Ma ZF, Xu L, Wu JJ, Sun YJ, Duan YZ, Lin Z, Jin Y. Apical tooth germ cell-conditioned medium enhances the differentiation of periodontal ligament stem cells into cementum/periodontal ligament-like tissues. *J Periodontol Res*. 2009 Apr;44(2):199-210
23. 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 Apr;24(2):155-65
24. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009 Sep;88(9):792-806
25. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GT. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod*. 2008 Feb;34(2):166-71
26. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng*. 2001 Dec;7(6):679-89

27. Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J, Vacanti JP Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 21;103(8):2480-7
28. Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*. 1996 Jan;17(2):93-102
29. 17. Burdick JA, Anseth KS. Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2002 Nov;23(22):4315-23
30. Jadlowiec JA, Celil AB, Hollinger JO. Bone tissue engineering: recent advances and promising therapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther*. 2003 Jun;3(3):409-23
31. Jell G, Stevens MM. Gene activation by bioactive glasses. *J Mater Sci Mater Med*. 2006 Nov;17(11):997-1002
32. Hu S, Chang J, Liu M, Ning C. Study on antibacterial effect of 45S5 Bioglass((R)). *J Mater Sci Mater Med*. 2009 Jan;20(1):281-6
33. Saravanapavan P, Jones JR, Verrier S, Beilby R, Shirtliff VJ, Hench LL, Polak JM. Binary CaO-SiO(2) gel-glasses for biomedical applications. *Biomed Mater Eng*. 2004;14(4):467-86
34. Sepulveda P, Jones JR, Hench LL. Bioactive sol-gel foams for tissue repair. *J Biomed Mater Res*. 2002 Feb;59(2):340-8
35. Andrade AL, Andrade SP, Domingues RZ. In vivo performance of a sol-gel glass-coated collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2006 Oct;79(1):122-8
36. Leach JK, Kaigler D, Wang Z, Krebsbach PH, Mooney DJ. Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration. *Biomaterials*. 2006 Jun;27(17):3249-55
37. Keshaw H, Georgiou G, Blaker JJ, Forbes A, Knowles JC, Day RM. Assessment of Polymer/Bioactive Glass-Composite Microporous Spheres for Tissue Regeneration Applications. *Tissue Eng Part A*. 2008 Dec 6
38. Murray PE. Constructs and scaffolds employed to regenerate dental tissue. *Dent Clin North Am*. 2012 Jul;56(3):577-88
39. Lane JM.. Bone morphogenic protein science and studies. *J Orthop Trauma* 2005 Nov-Dec;19(10 Suppl):S17-22
40. Nakashima M, Nagasawa H, Yamada H, Reddi AH: Regulatory role of transforming growth factor-beta ,bone morphogenic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Dev Biol* 1994;162:18-28

41. He H, Yu J, Liu Y, Lu S, Liu H, Shi J, Jin Y. Effects of FGF2 and TGFbeta1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell Biol Int*. 2008 Jul;32(7):827-34
42. Pääkkönen V, Vuoristo J, Salo T, Tjäderhane L. Effects of TGF-beta 1 on interleukin profile of human dental pulp and odontoblasts. *Cytokine*. 2007 Oct;40(1):44-51
43. 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 Apr;39(2):153-60
44. DenBesten PK, Machule D, Gallagher R, Marshall GW Jr, Mathews C, Filvaroff E. The effect of TGF-beta 2 on dentin apposition and hardness in transgenic mice. *Adv Dent Res*. 2001 Aug;15:39-41
45. 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 Feb;44(2):149-56
46. Chen S, Gluhak-Heinrich J, Martinez M, Li T, Wu Y, Chuang HH, Chen L, Dong J, Gay I, MacDougall M. Bone morphogenetic protein 2 mediates dentin sialophosphoprotein expression and odontoblast differentiation via NF-Y signaling. *J Biol Chem*. 2008 Jul 11;283(28):19359-70
47. Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. *J Endod*. 2004 Apr;30(4):205-8
48. Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res*. 2004 Aug;83(8):590-5
49. Hosoya A, Kim JY, Cho SW, Jung HS. BMP4 signaling regulates formation of Hertwig's epithelial root sheath during tooth root development. *Cell Tissue Res*. 2008 Sep;333(3):503-9
50. About I, Laurent-Maquin D, Lendahl U, Mitsiadis TA. Nestin expression in embryonic and adult human teeth under normal and pathological conditions. *Am J Pathol*. 2000 Jul;157(1):287-95
51. Lin ZM, Qin W, Zhang NH, Xiao L, Ling JQ. Adenovirus-mediated recombinant human bone morphogenetic protein-7 expression promotes differentiation of human dental pulp cells. *J Endod*. 2007 Aug;33(8):930-5
52. Sloan AJ, Rutherford RB, Smith AJ. Stimulation of the rat dentine-pulp complex by bone morphogenetic protein-7 in vitro. *Arch Oral Biol*. 2000 Feb;45(2):173-7
53. Nakashima M, Tachibana K, Iohara K, Ito M, Ishikawa M, Akamine A. Induction of reparative dentin formation by ultrasound-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11. *Hum Gene Ther*. 2003 Apr 10;14(6):591-7

54. Arany S, Koyota S, Sugiyama T. Nerve growth factor promotes differentiation of odontoblast-like cells. *J Cell Biochem*. 2009 Jan 23
55. Nakashima M. Tissue engineering in endodontics. *Aust Endod J*. 2005 Dec;31(3):111-3
56. Hørsted P, Nygaard-Ostby B. Tissue formation in the root canal after total pulpectomy and partial root filling. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1978 Aug;46(2):275-82
57. Barker BC, Mayne JR. Some unusual cases of apexification subsequent to trauma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1975 Jan;39(1):144-50
58. Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. .Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract *Dent Traumatol*. 2001 Aug;17(4):185-7
59. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod*. 2004 Apr;30(4):196-200
60. Thibodeau B, Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatr Dent*. 2007 Jan-Feb;29(1):47-50
61. Sato I, Ando-Kurihara N, Kota K, Iwaku M, Hoshino E. Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. *Int Endod J* 1996;29:118 –24
62. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J* 1996;29:125–30
63. Cotti E, Mereu M, Lusso D. Regenerative treatment of an immature, traumatized tooth with apical periodontitis: report of a case. *J Endod*. 2008 May;34(5):611-6
64. Iwaya S, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with periradicular abscess after luxation. *Dent Traumatol*. 2011 Feb;27(1):55-8
65. Cehreli ZC, Isbitiren B, Sara S, Erbas G. Regenerative endodontic treatment (revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: a case series. *J Endod*. 2011 Sep;37(9):1327-30
66. Ostby BN. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta Odontol Scand*. 1961 Dec;19:324-53
67. Samara A, Sarri Y, Stravopodis D, Tzanetakis GN, Kontakiotis EG, Anastasiadou E. A comparative study of the effects of three root-end filling materials on proliferation and adherence of human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod*. 2011 Jun;37(6):865-70
68. Kling M, Cvek M, Mejare I. Rate and predictability of pulp revascularization in therapeutically reimplanted permanent incisors. *Endod Dent Traumatol* 1986;2:83–9

69. Laureys WG, Cuvelier CA, Dermaut LR, De Pauw GA. The critical apical diameter to obtain regeneration of the pulp tissue after tooth transplantation, replantation, or regenerative endodontic treatment. *J Endod.* 2013 Jun;39(6):759-63
70. Kontakiotis EG, Filippatos CG, Agrafioti A. Levels of Evidence for the Outcome of Regenerative Endodontic Therapy. *J Endod.* 2014 Aug;40(8):1045-1053
71. Thomson A, Kahler B. Regenerative endodontics--biologically-based treatment for immature permanent teeth: a case report and review of the literature. *Aust Dent J.* 2010 Dec;55(4):446-52
72. Uchil RR, Kohli GS, Katekhaye VM, Swami OC. Strategies to combat antimicrobial resistance. *J Clin Diagn Res.* 2014 Jul;8(7):ME01-4
73. Kim JH, Kim Y, Shin SJ, Park JW, Jung IY. Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *J Endod.* 2010 Jun;36(6):1086-91
74. Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CC, Diogenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *J Endod.* 2012 Oct;38(10):1372-5
75. Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J.* 2011 Aug;44(8):697-730
76. Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* 1999 Sep;32(5):361-9
77. Kontakiotis E, Nakou M, Georgopoulou M. In vitro study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. *Int Endod J.* 1995 Nov;28(6):285-9
78. Rödiger T, Vogel S, Zapf A, Hülsmann M. Efficacy of different irrigants in the removal of calcium hydroxide from root canals. *Int Endod J.* 2010 Jun;43(6):519-27
79. Taşdemir T, Celik D, Er K, Yildirim T, Ceyhanli KT, Yeşilyurt C. Efficacy of several techniques for the removal of calcium hydroxide medicament from root canals. *Int Endod J.* 2011 Jun;44(6):505-9
80. Lambrianidis T, Kosti E, Boutsoukias C, Mazinis M. Removal efficacy of various calcium hydroxide/chlorhexidine medicaments from the root canal. *Int Endod J.* 2006 Jan;39(1):55-61
81. Berkhoff JA, Chen PB, Teixeira FB, Diogenes A. Evaluation of triple antibiotic paste removal by different irrigation procedures. *J Endod.* 2014 Aug;40(8):1172-7
82. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997 Sep;30(5):297-306

83. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germfree and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965 Sep;20:340-9
84. Delivanis PD, Mattison GD, Mendel RW. The survivability of F43 strain of *Streptococcus sanguis* in root canals filled with gutta-percha and Procosol cement. *J Endod.* 1983 Oct;9(10):407-10
85. Pang NS, Lee SJ, Kim E, Shin DM, Cho SW, Park W, Zhang X, Jung IY. Effect of EDTA on attachment and differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod.* 2014 Jun;40(6):811-7
86. Zarei M, Afkhami F, Malek Poor Z. Fracture resistance of human root dentin exposed to calcium hydroxide intervisit medication at various time periods: an in vitro study. *Dent Traumatol.* 2013 Apr;29(2):156-60