

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΤΟΜΑΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανοσοϊστοχημική μελέτη πρώιμων αποκρίσεων
του πολφού έπειτα από άμεση κάλυψη,
σε ένα *ex vivo* μοντέλο ανθρώπινου δοντιού**

ΔΟΥΚΑΚΗ ΔΑΦΝΗ

ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2019

Επιβλέπουσα καθηγήτρια για την εκπόνηση της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής
Εργασίας: κ. Κιτράκη Ευθυμία

Τριμελής επιτροπή για την Αξιολόγηση της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας:

1. κ. **Κιτράκη Ευθυμία**, Καθηγήτρια Βιολογίας
2. κ. **Κερεζούδης Νικόλαος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηρίου Ενδοδοντίας
3. κ. **Ραχιώτης Χρήστος**, Αναπληρωτής Καθηγητής
Εργαστηρίου Οδοντικής Χειρουργικής

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	5
A. Γενικό μέρος	7
1. Οδοντικός Πολφός	8
1.1 Εμβρυογένεση του οδοντικού πολφού	8
1.2 Ιστολογία του οδοντικού πολφού	9
1.3 Τύποι κυττάρων του οδοντικού πολφού	12
2. Οδοντίνη	15
3. Η οδοντινική σιαλοπρωτεΐνη (DSP)	16
4. Η οστεοποντίνη (OPN)	18
5. Οξειδωτικό στρες	19
6. Η θειορεδοξίνη (TRX)	20
7. Ενδοπλασματικό δίκτυο	22
7.1 Λειτουργίες του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου	23
7.2 Στρες του ενδοπλασματικού δικτύου	24
8. Η πρωτεΐνη ERdj5	26
9. Υλικά κάλυψης οδοντικού πολφού	28
9.1 Επίδραση υλικών κάλυψης στο σύμπλεγμα πολφού-οδοντίνης	29
9.1.1 Υδροξείδιο του ασβεστίου ($\text{Ca}(\text{OH})_2$)	29
9.1.2 Οι συγκολλητικοί παράγοντες	29
B. Ειδικό μέρος	32
1. Σκοπός	33
2. Υλικά και Μεθοδολογία	34
2.1 Προέλευση δειγμάτων	34
2.2 Ανοσοϊστοχημεία	37
2.3 Ποσοτικοποίηση σήματος ανοσοϊστοχημείας	40

2.4 Στατιστική ανάλυση	41
3. Αποτελέσματα	43
3.1. Αλλαγές στα επίπεδα της OPN.....	43
3.2. Αλλαγές στα επίπεδα της DSP	50
3.3. Αλλαγές στα επίπεδα της ERdj5.....	57
3.4. Αλλαγές στα επίπεδα της TRXR1	64
4. Συζήτηση	71
5. Συμπεράσματα	78
Γ. Περίληψη	79
Δ. Abstract.....	81
Ε. Βιβλιογραφία	83

Πρόλογος

Η προοπτική νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων, σε συνδυασμό με την μελέτη σε μοριακό επίπεδο της αναγεννητικής ικανότητας των ιστών και των οργάνων βρίσκεται στο επίκεντρο των ερευνών των επιστημών υγείας. Αδιαμφισβήτητα, το γεγονός αυτό έχει επηρεάσει και την οδοντιατρική επιστήμη, η οποία μεταξύ άλλων, στρέφεται προς την κατανόηση των επανορθωτικών μηχανισμών που ενεργοποιούνται στο σύστημα οδοντίνης – πολφού μετά από την προσβολή του. Παράλληλα πραγματοποιούνται μελέτες βιοσυμβατότητας, καθώς και αποτελεσματικότητας των υλικών που αν και έχουν καθιερωθεί η εφαρμογή τους απευθείας στον πολφό δεν είναι τεκμηριωμένη, όπως για παράδειγμα τα συγκολλητικά συστήματα των σύνθετων ρητινών. Τέλος, πολλά υποσχόμενες, παρουσιάζονται οι δοκιμές με νέους παράγοντες, όπως για παράδειγμα τους αυξητικούς παράγοντες, που θα μπορούσαν να ενεργοποιήσουν τους ήδη υπάρχοντες εγγενείς αναγεννητικούς μηχανισμούς του πολφού.

Η παρούσα διπλωματική εργασία, εκπονήθηκε στα πλαίσια της ολοκλήρωσης του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών με τίτλο «Βιολογία Στόματος» του τμήματος Οδοντιατρικής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και στοχεύει στην περαιτέρω διερεύνηση της ιστικής ακεραιότητας και των επιπέδων του κυτταρικού στρες, έπειτα από την άμεση κάλυψη του πολφού με τρία διαφορετικά συγκολλητικά συστήματα και πάστα υδροξειδίου του ασβεστίου.

Σκοπός κατά την εκπόνηση του πειραματικού μέρους της παρούσης και εν συνεχεία κατά την υλοποίηση της ίδιας της διπλωματικής εργασίας ήταν η ορθή και πλήρης ανάλυση του θέματος, μέσα από την εξέταση ειδικών ζητημάτων και από την χρήση των αποτελεσμάτων του πειραματικού μέρους για την εξαγωγή των συμπερασμάτων. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε έτσι ώστε το περιεχόμενο της εργασίας να καθίσταται κατανοητό και εναργές για τον αναγνώστη, με χρήση βοηθητικών γραφημάτων, πινάκων και εικόνων.

Εγκάρδιες ευχαριστίες εκφράζονται προς την επιβλέπουσα καθηγήτρια και υπεύθυνη του μεταπτυχιακού προγράμματος κα Κιτράκη Ευθυμία για τη στήριξη, τη

βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές της, οι οποίες αδιαμφισβήτητα συνέβαλαν στη βελτίωση και στην ολοκλήρωση του παρόντος πονήματος.

Ευχαριστίες εκφράζονται προς τον κο. Ραχιώτη Χρήστο, επίκουρο καθηγητή στο εργαστήριο Οδοντικής Χειρουργικής καθώς επίσης και προς τον κο. Κερεζούδη Νικόλαο, αναπληρωτή καθηγητή στο εργαστήριο Ενδοδοντίας για την προθυμία τους, τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις τους, που συνέβαλαν καθοριστικά στην ποιότητα της διπλωματικής εργασίας.

Δεν θα ήταν δυνατό να παραληφθούν και οι θερμές ευχαριστίες προς την Δρ. Ποιμένοβα Άννα, η οποία παραχώρησε πολύτιμο υλικό, που αποτέλεσε τη βάση της διπλωματικής εργασίας και δόθηκαν σημαντικές κατευθυντήριες για την επίτευξη των στόχων αυτής.

Φυσικά, η επίτευξή του σκοπού θα ήταν δυσχερέστατη χωρίς και την ενεργή συνεισφορά όλων των διδασκόντων, που με συνέπεια μεταφέρουν τις σημαντικές γνώσεις τους, δίνοντας έτσι την ευκαιρία σε όλους τους μεταπτυχιακούς φοιτητές να κατανοήσουν και να περιδιαβούν τα δύσκολα μονοπάτια της επιστήμης.

Ξεχωριστά, τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου αλλά και τα φιλικά μου πρόσωπα, που στάθηκαν δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια, για την στήριξη και για την υπομονή που επέδειξαν.

A. Γενικό μέρος

1. Ο ΟΔΟΝΤΙΚΟΣ ΠΟΛΦΟΣ

ΓΕΝΙΚΑ

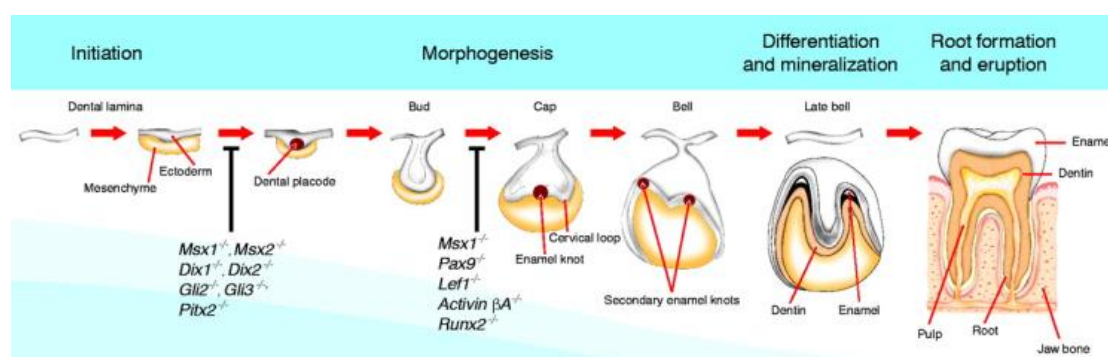
Ο οδοντικός πολφός είναι ένας χαλαρός αγγειοβριθής συνδετικός ιστός, ο οποίος εδράζεται εσωτερικά στο κεντρικό τμήμα του δοντιού και διακρίνεται στον μυλικό και ριζικό πολφό (Κακάμπουρα, Βουγιουκλάκης 2012). Ο πολφός βρίσκεται μέσα στον πολφικό θάλαμο, δηλαδή στον εσωτερικό χώρο του δοντιού που αφορίζεται περιφερικά από την περιπολφική οδοντίνη και ακρορριζικά από το επίπεδο της οδοντινοοστεϊνικής ένωσης (Συκαράς 2007). Ο πολφικός θάλαμος αποτελεί μια κοιλότητα με ανένδοτα τοιχώματα αδαμαντίνης, οδοντίνης και οστεΐνης που παρέχουν στον πολφό τόσο μηχανική προστασία όσο και προστασία από το μικροβιακό φορτίο στο στοματικό περιβάλλον (Yu and Abbott 2007). Ο πολφός αποτελεί ένα ευαίσθητο και εξειδικευμένο όργανο το οποίο περιέχει κύτταρα, λεπτά αιμοφόρα αγγεία, νευρικός ίνες και νευρικές απολήξεις οι οποίες εισέρχονται στην οδοντίνη. Για αυτό το λόγο αναφέρονται πολλές φορές και ως ενιαία μονάδα με την ονομασία οδοντινο-πολφικό σύμπλεγμα (Κακάμπουρα, Βουγιουκλάκης 2012).

1.1 ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΟΔΟΝΤΙΚΟΥ ΠΟΛΦΟΥ

Ο οδοντικός πολφός (πολφικός ιστός) προέρχεται από τα μεσεγχυματικά κύτταρα του κρανιακού εξωμεσεγχύματος, το οποίο αναπτύσσεται στην κρανιακή νευρική ακρολοφία (Baumann 2014). Η διαδικασία της οδοντικής διάπλασης ξεκινά με τη μετανάστευση μεσεγχυματικών κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας στις περιοχές των γνάθων κατά την 6^η εμβρυϊκή εβδομάδα. Η πορεία της καθορίζεται από την αλληλεπίδραση των κυττάρων εξωμεσεγχυματικής προέλευσης με κύτταρα από το στοματικό εξώδερμα, τα οποία δημιουργούν μια πεταλοειδή πάχυνση, την οδοντική ταινία (Carlson 1999, Nanci 2012).

Ακολουθεί ο σχηματισμός των οδοντικών σπερμάτων, από αρχέγονα επιθηλιακά κύτταρα κατά την ανάπτυξη της οδοντικής ταινίας μέσα στο μεσέγχυμα. Στη συνέχεια το επιθηλιακής προέλευσης τμήμα σχηματίζει το όργανο της αδαμαντίνης (Carlson 1999, Baumann 2014). Στην κοίλη επιφάνεια του οργάνου της αδαμαντίνης βρίσκεται

ένα σύνολο μεσεγχυματικών κυττάρων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα κύτταρα αυτά μπορεί να μην προέρχονται μόνο από την νευρική ακρολοφία αλλά μπορεί να προέρχονται και από το παραξονικό μεσόδερμα ή ακόμα να βρίσκονταν εκεί (Goldberg & Smith 2004). Τα κύτταρα αυτά αποτελούν την οδοντική θηλή, από την οποία θα προέλθει ο πολφός (Yu and Abbott 2007), όταν θα εμφανιστεί η πρώτη ενασβεστωμένη μήτρα στην κορυφή του φύματος του οδοντικού σπέρματος (γνωστό ως στάδιο του κώδωνα) (Thesleff 2003, Lacruz et al 2017). Κατά το στάδιο του κώδωνα λαμβάνει χώρα η τελική διαφοροποίηση των κυττάρων που σχηματίζουν τα δόντια (οδοντινοβλάστες και αδαμαντινοβλάστες) (Thesleff 2003).



Εικόνα 1. Στάδια ανάπτυξης των δοντιών. Σηματοδότηση κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης (signalling in tooth development). Κατά την 6^η και 7^η εμβρυϊκή εβδομάδα παρατηρείται ο σχηματισμός της οδοντικής ταινίας και η καταβολή των δοντιών αντίστοιχα. Κατά την 8^η εμβρυϊκή εβδομάδα, στο στάδιο του κυπέλλου δημιουργείται κάτω από την οδοντική ταινία το όργανο της αδαμαντίνης και η οδοντική θηλή. Από την 10^η εμβρυϊκή εβδομάδα παρατηρείται το στάδιο του κώδωνα για να δημιουργηθεί ο οδοντικός θύλακος στο τέλος της 14^{ης} εμβρυϊκής εβδομάδας. Στο τελευταίο στάδιο σειρά έχει η διαφοροποίηση και η ενασβεστίωση των κυττάρων πριν την ανατολή τους στο στοματικό περιβάλλον και την τελείωση-σχηματισμό της ρίζας τους (Thesleff 2003).

1.2 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΟΔΟΝΤΙΚΟΥ ΠΟΛΦΟΥ

Ο οδοντικός πολφός αποτελείται από εξωκυττάρια μήτρα (κυρίως ίνες κολλαγόνου τύπου I-56% και III-41%), νεύρα, αγγεία και διαφορετικούς τύπους κυττάρων (Goldberg and Smith 2004).

Ο πολφός των ώριμων δοντιών, αυτών δηλαδή που έχουν διαπλασμένο ακρορρίζιο μπορεί να διαιρεθεί σε τέσσερις ανατομικές περιοχές. Από την περιφέρεια και με κατεύθυνση προς το κέντρο του πολφικού ιστού διακρίνονται:

1. Η οδοντινοβλαστική στοιβάδα
2. Η ακύτταρη ζώνη του Weil
3. Η πολυκύτταρη ζώνη
4. Η κεντρική μοίρα του πολφικού ιστού

1. Η οδοντινοβλαστική στοιβάδα:

Εντοπίζεται αμέσως μετά την προοδοντίνη και αποτελείται από τα κυτταρικά σώματα των οδοντινοβλαστών, οι αποφυάδες των οποίων επεκτείνονται μέσα στα οδοντινοσωληνάρια. Στην περιοχή του μυλικού πολφού, έπειτα από ιστολογική παρατήρηση, η οδοντινοβλαστική στοιβάδα παρουσιάζει πασσαλοειδή διάταξη στοιβάδων βασεόφιλων κυττάρων υψηλού κυλινδρικού σχήματος. Το πάχος της στοιβάδας αυτής παρουσιάζει λέπτυνση προς την περιοχή της ρίζας, όπου τα κύτταρα εμφανίζονται κυβοειδή, με αποτέλεσμα να καταλήγουν αραιά και αποπεπλατυσμένα στο ακρορρίζιο.

2. Η ακύτταρη ζώνη του Weil

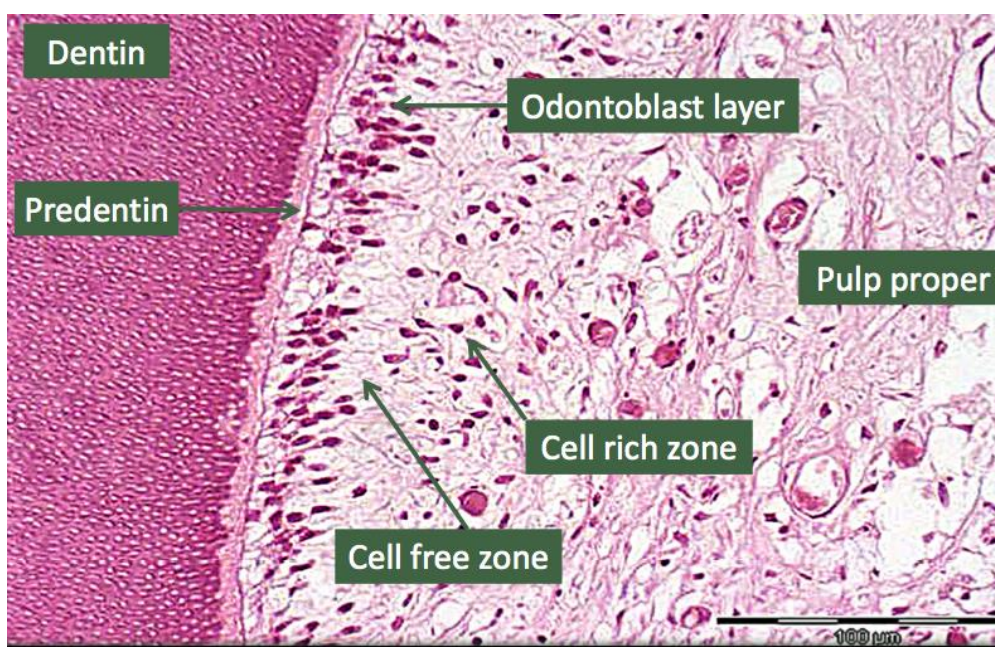
Η περιοχή αυτή όπως περιγράφεται και από την ονομασία της αφορά μια περιοχή που βρίσκεται κάτω από την οδοντινοβλαστική στοιβάδα και στερείται κυττάρων, με εύρος που φτάνει έως και τα 40 μm . Η ακύτταρη ζώνη του Weil αποτελείται από τριχοειδή αγγεία προερχόμενα από το υποοδοντινοβλαστικό αγγειακό πλέγμα, νευρικές ίνες του υποοδοντινοβλαστικού νευρικού πλέγματος και τις κυτταροπλασματικές αποφυάδες των ινοβλαστών της πολυκυτταρικής ζώνης. Η ζώνη αυτή απαντάται μόνο σε ακέραια δόντια μετά την ολοκλήρωση της αναπτυξιακής ανατολής. Σε περίπτωση επίδρασης βλαπτικών ερεθισμάτων κατά τη διάρκεια της λειτουργικής περιόδου των δοντιών, διηθείται σε όλο το εύρος της από αμυντικά πολφικά κύτταρα.

3. Η πολυκύτταρη ζώνη

Πρόκειται για μια ανατομική περιοχή η οποία χαρακτηρίζεται από μεγάλο αριθμό κυττάρων σε σχέση με το υπόλοιπο πολφικό παρέγχυμα και ανιχνεύεται κάτω από την ακύτταρη ζώνη του Weil. Περιέχει κυρίως ινοβλάστες και αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα, καθώς επίσης λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα, νεύρα και αγγεία. Η περιοχή αυτή μπορεί να χαρακτηριστεί και ως κυτταρική εφεδρεία της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας διότι περιλαμβάνει και κύτταρα που έχουν κοινό αναπτυξιακό ιστορικό με τους οδοντινοβλάστες. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από τους προοδοντινοβλάστες και ονομάζονται κύτταρα του Hohl. Υπάρχει το ενδεχόμενο, ο σχηματισμός της ζώνης να οφείλεται σε μετανάστευση κυττάρων από το κέντρο του πολφικού ιστού ως αντίδραση στην έκθεση της μύλης στο στοματικό περιβάλλον.

4. Η κεντρική μοίρα του πολφικού ιστού

Η περιοχή αυτή συνιστά το παρέγχυμα του πολφού. Είναι ένας χαλαρός συνδετικός ιστός με αραιή συγκέντρωση κυττάρων και κολλαγόνων ινών εμβυθισμένων στη θεμέλια ουσία (Συκαράς 2007, Couve et al 2013).



Εικόνα 2. Ιστολογική εικόνα με τμήμα του οδοντικού πολφού. Απεικονίζονται: η οδοντινοβλαστική στοιβάδα (odontoblast layer), η ακύτταρη ζώνη του Weil (cell free zone), η πολυκύτταρη ζώνη (cell rich zone), η κεντρική μοίρα του πολφικού ιστού (pulp proper/core), η οδοντίνη (dentin) και η προοδοντίνη (predentin) (Goldberg et al 2012).

1.3 ΤΥΠΟΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΟΔΟΝΤΙΚΟΥ ΠΟΛΦΟΥ

Στο πολφικό παρέγχυμα συναντώνται έξι τύποι κυττάρων ως μόνιμα κυτταρικά στοιχεία (οδοντινοβλάστες, ινοβλάστες, ινοκύτταρα, αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα, περικύτταρα και ιστιοκύτταρα) και τρεις ως μη μόνιμα αμυντικά κυτταρικά στοιχεία (Συκαράς 2007).

Μόνιμα κυτταρικά στοιχεία

1. **Οδοντινοβλάστες** – αποτελούν τα κύτταρα υψηλότερης διαφοροποίησης του πολφικού ιστού. Μετά τη διαφοροποίησή τους σταματούν να πολλαπλασιάζονται, για αυτό χαρακτηρίζονται και ως μετά-μιτωτικά κύτταρα. Σημαντική είναι η συμβολή τους καθ'όλη τη διάρκεια ζωής ενός υγιούς δοντιού, αφού επιβιώνουν και εναποθέτουν προοδοντίνη. Το μέγεθος του κυτταρικού τοιχώματος, το σχήμα τους και ο προσανατολισμός των οργανιδίων τους εξαρτώνται άμεσα από το βαθμό λειτουργικής διαφοροποίησης και συνθετικής δραστηριότητας, αφού μεταβάλλονται ανάλογα με την εντόπιση τους (Couve 1986). Οι οδοντινοβλάστες λαμβάνουν μέρος στην κυτταρική άμυνα ενάντια στα παθογόνα καθώς και στην μεταφορά των ερεθισμάτων από το σύμπλεγμα οδοντίνης πολφού (Συκαράς 2007).

2. **Ινοβλάστες** - αποτελούν τον μεγαλύτερο αριθμητικά πληθυσμό του πολφού και είναι μόνιμα κυτταρικά στοιχεία. Στον πολφικό ιστό συναντώνται σε μεγάλο αριθμό σε όλη την έκταση του και παρόλο που μορφολογικά φαίνονται παρόμοια μεταξύ τους, αποτελούν ετερογενή πληθυσμό (Συκαράς 2007, Moule et al 1995). Παρουσιάζουν σχήμα επίμηκες ή ανώμαλο ατρακτοειδές ή πολυγωνικό και καλά ανεπτυγμένα οργανίδια γεγονός που υποδεικνύει την βιοσυνθετική ικανότητά τους. Το κύριο προϊόν της βιοσυνθετικής τους λειτουργίας είναι το κολλαγόνο τύπου III. Επιπροσθέτως συμμετέχουν στη σύνθεση γλυκοπρωτεϊνών και γλυκοζαμινογλυκανών (Goldberg and Smith 2004, Συκαράς 2007).

3. **Ινοκύτταρα** - συνιστούν ανενεργές μορφές ινοβλαστών. Ξεχωρίζουν λόγω του μεγάλου και πολύμορφου πυρήνα τους, του ελάχιστου πρωτοπλάσματος γεγονός το

οποίο τα οδηγεί σε έλλειψη βιοσυνθετικής ικανότητας. Ο πληθυσμός τους κατά τη διάρκεια της ζωής του δοντιού τείνει να μειώνεται, μειώνοντας ταυτόχρονα και την αναγεννητική ικανότητα του πολφού ως απάντηση σε εξωτερικά ερεθίσματα (Συκαράς 2007).

4. Αδιαφοροποίητα μεσεγγυματικά κύτταρα (βλαστοκύτταρα)- Ανιχνεύονται για ένα μεγάλο διάστημα της ζωής του δοντιού, σε μικρό αριθμό, στον πολφό, τόσο στην πλούσια κυτταροβριθή ζώνη όσο και στις κεντρικές περιοχές του. Πρόκειται για κύτταρα που μοιάζουν με τους ινοβλάστες, με μικρότερο όμως μέγεθος από αυτούς. Παρουσιάζουν πολυδύναμη βιολογική συμπεριφορά για όσο παραμένουν αδιαφοροποίητα. Σε ενδεχόμενη φλεγμονή και επανόρθωση του πολφού, διαιρούνται και ανάλογα με τις απαιτήσεις διαφοροποιούνται ως προς όλους τους τύπους κυττάρων του πολφικού ιστού (οδοντινοβλάστες, ινοβλάστες, μακροφάγα, οστεοκλάστες – οδοντοκλάστες) (Συκαράς 2007).

Αδιαμφισβήτητα, τα τελευταία χρόνια μέσω της έρευνας στην επιστήμη της βιολογίας και το πεδίο της οδοντικής ανάπτυξης, έχειδειχτεί η ικανότητα των κυττάρων αυτών να διαφοροποιούνται (*in vivo, in vitro*) ως προς οστεοβλάστες, νευρώνες, χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα, ηπατοκύτταρα, μυοβλάστες, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά, λιποκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα (Gronthos et al 2000, Graziano et al 2008, Casagrande et al 2012, Pisciotta et al 2012, Petridis et al 2015, d'Aquino et al 2009, Huang et al 2009).

5. Ιστιοκύτταρα (μακροφάγα των ιστών) - Προέρχονται από την αιματική κυκλοφορία ή από διαφοροποίηση πολφικών κυττάρων και μορφολογικά εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία. Συνήθως τα συναντάμε στον περιαγγειακό χώρο. Επίσης συναντώνται σε υγιείς πολφούς, σε μικρό αριθμό, οι οποίοι δεν έχουν δεχτεί κανένα λειτουργικό ερέθισμα όπως είναι αυτοί των εγκλείστων δοντιών (Συκαράς 2007).

6. Περικύτταρα - Συναντώνται στην εξωτερική επιφάνεια των προτριχοειδών και των μετααρτηριδίων. Η ύπαρξή τους έχει σημειωθεί πως οφείλεται στη συστολή των αγγείων. Επιπλέον έχει αναφερθεί η πιθανή παραγωγή συνδετικού ιστού από αυτά

γύρω από τα προτριχοειδή, ενώ θεωρούνται προγονικές μορφές των νέων οδοντινοβλαστών (Συκαράς 2007).

Ακόμη ανευρίσκονται μόνιμα κύτταρα μεταξύ των οδοντινοβλαστών και του πολφικού παρεγχύματος, γνωστά ως **δενδριτικά κύτταρα**. Τα αντιγονοπαρουσιαστικά δενδριτικά κύτταρα είναι ανοσοδιεγερτικές μορφές του ανοσοποιητικού συστήματος του πολφού και έχουν ρόλο διέγερσης παραγωγής ειδικών λεμφοκυττάρων έπειτα από την αναγνώριση αντιγονικών ερεθισμάτων (Συκαράς 2007, Jontell et al 1998).

Μη μόνιμα αμυντικά κυτταρικά στοιχεία

1-πλασματοκύτταρα, 2-λεμφοκύτταρα, 3-ηωσινόφιλα πολυμορφοπύρρηνα

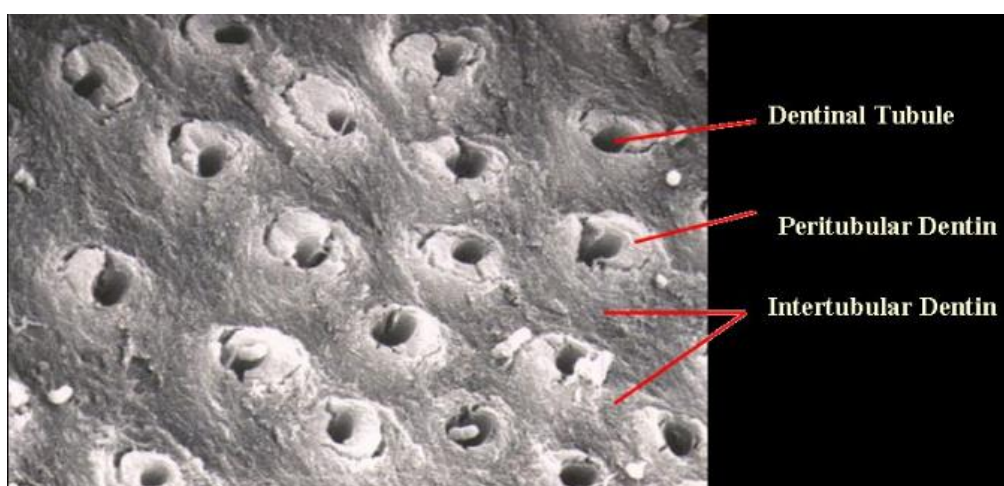
Τα βρίσκουμε στον πολφό των δοντιών είναι όμως αβέβαιο το εάν αυτά τα κύτταρα υπάρχουν σε πολφούς ακέραιων δοντιών με υγιείς οδοντικούς ιστούς. Η ύπαρξη τους παραπέμπει σε ερεθίσματα αντιγονικής φύσης που δέχεται ο πολφός (κυρίως μυλικός), από το στοματικό περιβάλλον (Goldberg and Smith 2004, Συκαράς 2007).

2.ΟΔΟΝΤΙΝΗ

Η οδοντίνη είναι ένας ιστός, σκληρός αλλά ευπροσάρμοστος. Έχει χημική σύσταση παρόμοια με εκείνη του οστού με μεγαλύτερη όμως περιεκτικότητα σε άλατα ασβεστίου. Αποτελείται κυρίως από κρυστάλλους υδροξυαπατίτη (70% ανόργανη ουσία), οργανική υλικό όπως το κολλαγόνο τύπου I (18%) και νερό (12%).

Η οδοντίνη σχηματίζεται κατά την ανάπτυξη των δοντιών, από την έναρξη της κυτταρικής διαφοροποίησης των οδοντινοβλαστών στην περιφέρεια της οδοντικής θηλής έως την πλήρη ανατολή και διάπλαση του ακραίου τμήματος της ρίζας και ονομάζεται πρωτογενής οδοντίνη. Η εναπόθεση της όμως δεν σταματά καθώς σχηματίζεται και κατά τη μετά-αναπτυξιακή περίοδο. Αυτή ονομάζεται δευτερογενής οδοντίνη, ενώ αυτή που σχηματίζεται ως αντίδραση στην επίδραση των εξωτερικών ερεθισμάτων ονομάζεται τριτογενής αντιδραστική ή επανορθωτική οδοντίνη. Η δομή και η λειτουργία της πρωτογενούς οδοντίνης είναι αυτή που καθορίζει τη λειτουργική συμπεριφορά και τις ιδιότητες των οδοντικών ιστών.

Η οδοντίνη εμφανίζει ακτινωτή γράμμωση που οφείλεται στα οδοντικά σωληνάρια, τα οποία έχουν διάμετρο 3-5 μm και μήκος πάνω από 5 mm. Αυτά φέρονται γύρω από την πολφική κοιλότητα (σε σχήμα ακτίνας) και εμφανίζουν ελικοειδή πορεία, με τον αυλό τους να περιέχει την κυτταροπλασματική αποφυάδα ενός οδοντινοβλάστη (Netter 2008, Συκαράς 2007).



Εικόνα 3. Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) όπου διακρίνονται τα οδοντινοσωληνάρια και η οδοντίνη πέριξ αυτών (Nawfal et al 2014).

3. ΟΔΟΝΤΙΝΙΚΗ ΣΙΑΛΟΠΡΩΤΕΪΝΗ (DSP)

Η οδοντινική σιαλοπρωτεΐνη (DSP) αποτελεί μέρος της οδοντινικής σιαλοφωσφοπρωτεΐνης (DSPP), ενός πρωτεϊνικού μορίου που μετά την αποκοπή του προκύπτουν τρεις λειτουργικές πρωτεΐνες. Αναλυτικά οι πρωτεΐνες αυτές είναι η (DSP) - οδοντινική σιαλοπρωτεΐνη η οποία προκύπτει από το N - αμινοτελικό άκρο, η (DGP) - οδοντινική γλυκοπρωτεΐνη η οποία προέρχεται από το κεντρικό τμήμα του μορίου και η (DPP) - οδοντινική φωσφοπρωτεΐνη που προκύπτει από το C - καρβοξυλικό άκρο (Nanci 2012, Fujisawa and Tamura 2012).

Η οδοντινική σιαλοπρωτεΐνη (DSP) είναι μια όξινη πρωτεΐνη, με μοριακό βάρος 52,5 KDa, πλούσια σε ασπαρτικό οξύ, γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη, σερίνη ενώ δεν περιέχει φωσφόρο και κυστεΐνη (Butler et al 1992).

Ανήκει στην οικογένεια των μη κολλαγονούχων φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών, SIBLINGS (small integrin-binding N-linked glycoprotein). Εκτός από την DSPP, στην οικογένεια των πρωτεϊνών αυτών ανήκουν η οστεοποντίνη (OPN), η πρωτεΐνη της θεμέλιας ουσίας της οδοντίνης (DMP-1), η φωσφογλυκοπρωτεΐνη της εξωκυττάριας ουσίας (MEPE) και η οστική σιαλοπρωτεΐνη (BSP) (Bellahcene et al 2008, Fisher and Fedarko 2003).

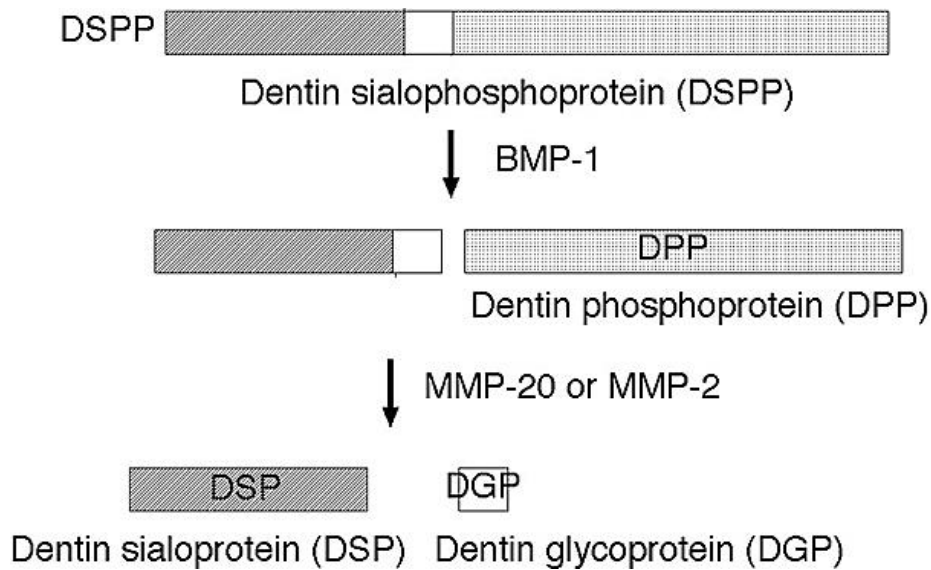
Η οδοντινική σιαλοπρωτεΐνη (DSP) και η (DPP) - οδοντινική φωσφοπρωτεΐνη έχουν ένα σημαντικό ρόλο κατά διάρκεια της ανάπτυξης των δοντιών. Γονιδιακές μεταλλάξεις είτε στην περιοχή της DSP είτε στην περιοχή της DPP δύνανται να προκαλέσουν ατελή οδοντινογένεση (dentinogenesis imperfect – DGI) τύπου II και τύπου III καθώς και οδοντινική δυσπλασία (dentin dysplasia-DD) (Suzuki et al 2009, Paine et al 2005, Xiao et al 2001).

Η (DSP) - οδοντινική σιαλοπρωτεΐνη, όπως και η (MEPE) - φωσφογλυκοπρωτεΐνη της εξωκυττάριας ουσίας και η (DMP-1)-πρωτεΐνη της θεμέλιας ουσίας της οδοντίνης, είναι πρωτεΐνες που χαρακτηρίζουν τους οδοντινοβλάστες. Ο ρόλος τους είναι η ρύθμιση της μεταλλικοποίησης του οργανικού υποστρώματος της οδοντίνης μέσω του σχηματισμού κρυστάλλων υδροξυαπατίτη. Θεωρείται πως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενασβεστίωση της επανορθωτικής οδοντίνης (Min et al 2008).

Η (DSP) αποτελεί μια σημαντική πρωτεΐνη της θεμέλιας ουσίας της οδοντίνης συμβάλλοντας στη μετατροπή της προοδοντίνης σε οδοντίνη (Suzuki et al 2009).

Χαρακτηρίζεται ως ειδικός δείκτης της οδοντίνης συμβάλλοντας στην διαφοροποίηση των οδοντικών μεσεγχυματικών κυττάρων προς οδοντινοβλάστες, προάγοντας το σχηματισμό της (Ritchie 2018, Wentong et al 2017, Baba et al 2004).

Η έκφραση της DSP φαίνεται να παραμένει ανεπηρέαστη σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες (Diamanti et al 2013), ενώ παρατηρείται ελάττωση των επιπέδων της κατά την κυτταρική γήρανση (Mehrazarin et al 2011).



Εικόνα 4. Η αποκοπή της DSPP σε τρεις λειτουργικές πρωτεΐνες: την οδοντινική σιαλοπρωτεΐνη (DSP), την οδοντινική φωσφοπρωτεΐνη (DPP) και την οδοντινική γλυκοπρωτεΐνη (DGP) (Fujisawa et al 2012).

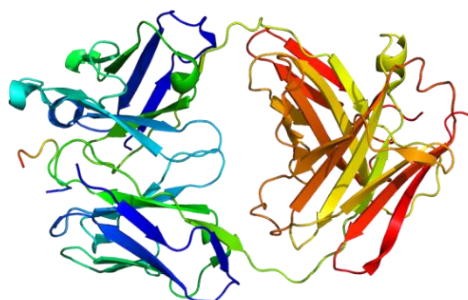
4. ΟΣΤΕΟΠΟΝΤΙΝΗ (OPN)

Η OPN είναι μια φωσφορυλιωμένη γλυκοπρωτεΐνη. Εντοπίζεται ως δομικό συστατικό (πρωτεΐνη) των επιμεταλλωμένων ιστών του ανθρώπινου οργανισμού καθώς και σε υγρά του σώματος (γάλα, αίμα, ούρα) σε ποικίλους ιστούς, κατέχοντας σημαντικό ρόλο τόσο σε φυσιολογικές, όσο και σε παθολογικές διεργασίες (Wai et al 2008).

Η έκφραση της οστεοποντίνης παρατηρείται σε πολλούς ιστούς. Πιο συγκεκριμένα εκφράζεται στη θεμέλια ουσία των οστών, την οστεΐνη και την οδοντίνη, αλλά και σε κύτταρα με αυλοειδείς επιθηλιακές επιφάνειες του γαστρεντερικού σωλήνα, της χοληδόχου κύστεως, του παγκρέατος, του ουροποιητικού και αναπαραγωγικού συστήματος, του πνεύμονα, του μαστού και των σιαλογόνων και ιδρωτοποιών αδένων. Επιπροσθέτως εκφράζεται στους ινοβλάστες, στους οστεοκλάστες, στους οστεοβλάστες, στα λεία μυϊκά κύτταρα, στα κύτταρα Kurpfer, στα δενδριτικά κύτταρα, στα ενεργοποιημένα μακροφάγα, στα T-λεμφοκύτταρα, στα B-λεμφοκύτταρα και τέλος στα NK – κύτταρα (κύτταρα φυσικοί φονείς, Natural Killers cells) (Brown et al 1992, Patarca et al 1993).

Η οστεοποντίνη (OPN, SPP1, BSP1 ή Eta – 1), που ετυμολογικά σημαίνει «οστική γέφυρα» (Oldberg et al 1986), είναι μια εκ των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών της οστικής θεμέλιας ουσίας οι οποίες έχουν μελετηθεί εκτενώς για την συμβολή τους στην οστική μετάσταση.

Ανήκει στις όξινες πρωτεΐνες μιας ομάδας γενετικά σχετιζόμενων πρωτεϊνών γνωστή ως SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein) και όπως προαναφέρθηκε και για την DSP, έχουν την ιδιότητα να συνδέονται ισχυρά με τον υδροξυαπατίτη (Fisher and Torchia 2001), διαδραματίζοντας όπως πιστεύεται ρόλο στην μεταλλικοποίηση του οργανικού υποστρώματος της οδοντίνης (Min et al 2008).



Εικόνα 5. Τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής της οστεοποντίνης (Jiamu et al 2008).

5. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Το οξυγόνο (O_2) αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα ύπαρξης ζωής. Βρίσκεται στον αέρα με τη μορφή του μοριακού O_2 και έχει την ικανότητα να δέχεται μονά ηλεκτρόνια που προέρχονται από τις οξειδωτικές διαδικασίες καταβολισμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την οξείδωση των τροφών και κατ' επέκταση την αποδέσμευση της απαραίτητης για τη ζωή ενέργειας. Το οξυγόνο όμως λόγω της ιδιότητας του αυτής (αποδοχής μονών ηλεκτρονίων), δημιουργεί δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS – reactive oxygen species) ή αλλιώς ελεύθερες ρίζες, οι οποίες αντιδρούν με όλα τα βασικά κυτταρικά μακρομόρια και προκαλούν βλάβες. Οι αερόβιοι οργανισμοί με σκοπό την προστασία τους και την εξουδετέρωση των ROS, έχουν αναπτύξει αντιοξειδωτικά συστήματα (Halliwell et al 1985).

Η διατάραξη της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του κυττάρου, η οποία προέρχεται από τα αυξημένα επίπεδα των ελευθέρων ριζών (ROS), ορίζεται ως **οξειδωτικό στρες** (Betteridge 2000). Η κατάσταση αυτή συνεπάγεται μη-αντιστρεπτές στη δομή και τη λειτουργία του κυττάρου μεταβολές, όπως βλάβες της κυτταροπ्लाσματικής μεμβράνης, αναστολή της δράσης των ενζύμων και άλλων πρωτεϊνών, αναστολή της σύνθεσης του DNA και του RNA, απόπτωση των κυττάρων κ.α. Η οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου, βασίζεται στην ισορροπία μεταξύ των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) και του προστατευτικού συστήματος του κυττάρου έναντι αυτών. Το προστατευτικό σύστημα του κυττάρου, περιλαμβάνει μια σειρά από ένζυμα όπως η γλουταθειόνη (GSH), η δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD), το σύστημα θειορεδοξίνης (Trx) και αναγωγάσης θειορεδοξίνης (TrxR), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και η καταλάση (CAT) (Watson et al 2004, Mathers et al 2004, Hayes et al 2005).

6. ΘΕΙΟΡΕΔΟΞΙΝΗ (TRX) και ΑΝΑΓΩΓΑΣΗ

ΤΗΣ ΘΕΙΟΡΕΔΟΞΙΝΗΣ (TRXR1)

Οι θειορεδοξίνες είναι οξειδοαναγωγικές πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους (12 KDa) και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες. Το σύστημα θειορεδοξίνης απαρτίζεται από τη θειορεδοξίνη, την αναγωγή της θειορεδοξίνης και το NADPH και ανευρίσκεται από τα αρχαιοβακτήρια μέχρι και τους ανθρώπους.

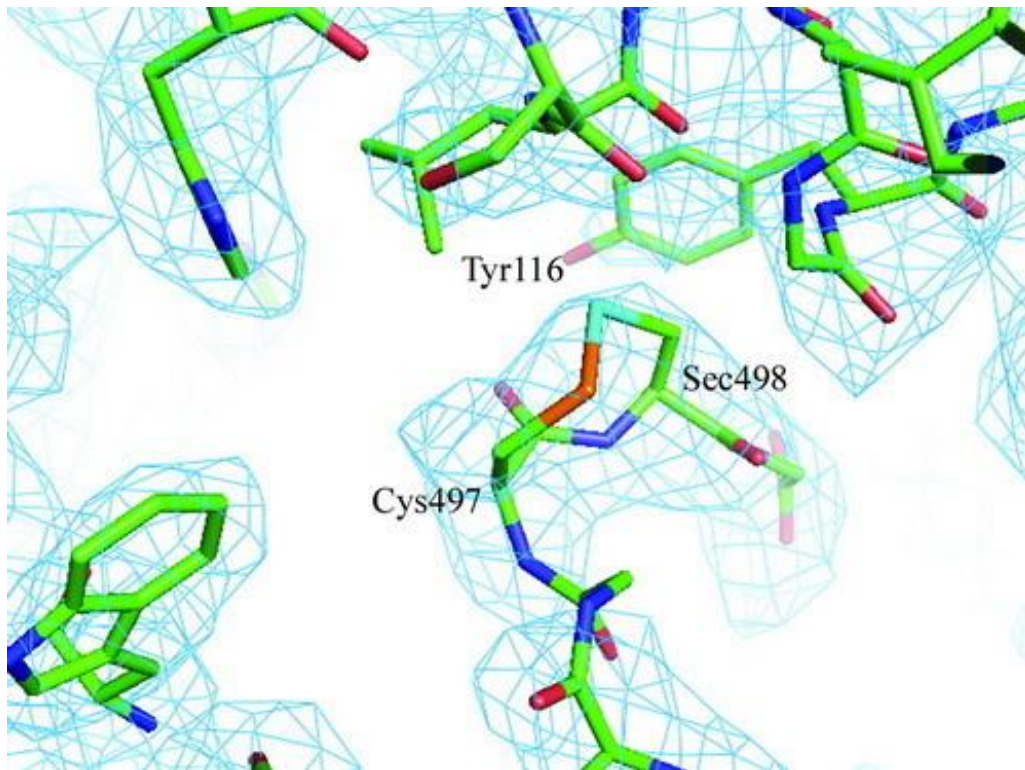
Το όνομά τους προέρχεται από την ικανότητά τους να συμμετέχουν στην οξειδοαναγωγική διαδικασία της δημιουργίας και αναίρεσης ενδοπρωτεϊνικών ή/και διαπρωτεϊνικών δισουλφιδικών δεσμών άλλων πρωτεϊνών. Η αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών από τις θειορεδοξίνες βασίζεται σε μια διατηρημένη αλληλουχία (κυστεΐνη -X-X- κυστεΐνη) στο ενεργό κέντρο τους.

Οι θειορεδοξίνες ρυθμίζουν πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η σύνθεση του DNA (μέσω της αναγωγής των ριβονουκλεοτιδίων), ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η αναστολή της απόπτωσης, μέσω της αναστολής της MAP κινάσης) (Matsuzawa and Ichijo, 2008; Saitoh, Nishitoh et al., 1998), η ενεργότητα μεταγραφικών παραγόντων (όπως ο NF-κΒ και ο AP1), η έκφραση κυτταροκινών και τέλος η απομάκρυνση δραστικών μορφών οξυγόνου (Abate, Patel et al., 1990; Matthews, Wakasugi et al., 1992).

Έχουν βρεθεί δυο ισομορφές της θειορεδοξίνης, η TRX1 στο κυτταρόπλασμα και η TRX2 στα μιτοχόνδρια. Στα θηλαστικά, η έλλειψη της κυτταροπλασματικής θειορεδοξίνης, δύναται να προκαλέσει αδυναμία επιβίωσης των εμβρύων αφού επηρεάζει την άμυνα έναντι του οξειδωτικού στρες και ελέγχει την ανάπτυξη και την απόπτωση. Σημαντική επίσης είναι και η συνεισφορά της στην κύηση και στην προστασία του εμβρύου κατά τη διάρκεια της γέννησης.

Επιπροσθέτως, η θειορεδοξίνη έχει την ικανότητα να επιδιορθώνει τις πρωτεΐνες μέσω της αναγωγής του σουλφοξειδίου της μεθειονίνης, να ενεργοποιεί ή να αναστέλλει μεταγραφικούς παράγοντες και να συμμετέχει στην ανοσορύθμιση με δράση εξωκυττάριας συν-κυτοκίνης και χημειοκίνης (Arner and Holmgren 2000, Tanaka et al 2000). Σε περιπτώσεις διαταραχής ισορροπίας των οξειδοαναγωγικών

επιπέδων, έχει παρατηρηθεί μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης (Tanaka et al 2000, Goy et al 2014).



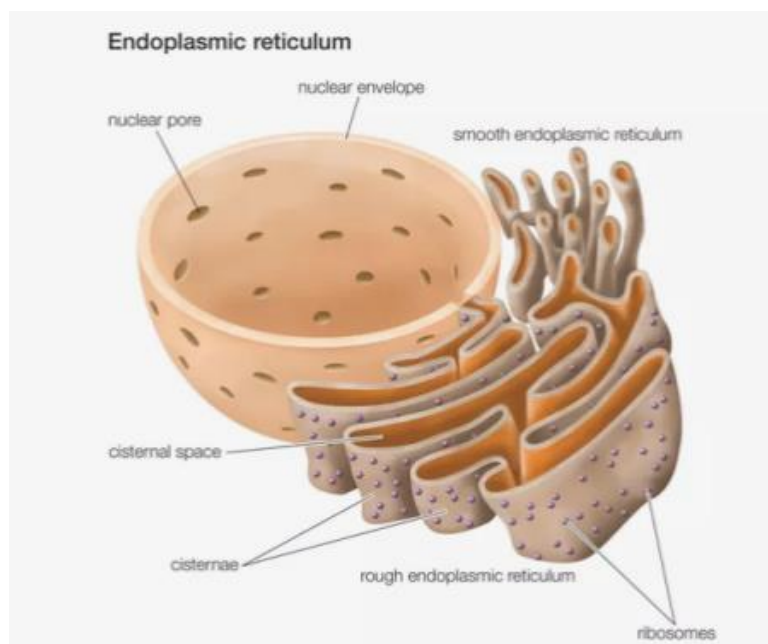
Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση κρυσταλλικής δομής της πρωτεΐνης TrxR1 (Cheng et al 2009).

7. ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟ ΔΙΚΤΥΟ

Το ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ / ER endoplasmic reticulum), είναι ένα εκτεταμένο μεμβρανικό δίκτυο, ελικοειδών, επικοινωνούντων, λεπτών σωληναρίων, μικρών σφαιρικών κυστιδίων και αποπεπλατισμένων μεμβρανωδών σάκων (δεξαμενών). Ο εσωτερικός του χώρος ονομάζεται αυλός (lumen) και η περιοχή εκτός των μεμβρανών, διαλυτή φάση. Το ενδοπλασματικό δίκτυο καταλαμβάνει πάνω από το 10 % του συνολικού όγκου του κυττάρου. Ανάλογα με το είδος και τη λειτουργία του κυττάρου, διαφέρει η ποσότητα του, η πολυπλοκότητα του και η διασπορά του. (Netter 2008, Μαρμαράς και συν 2005).

Οι δυο κυριότερες μορφές του ΕΔ είναι το λείο (ΛΕΔ) και το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (ΑΕΔ). Το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο καλύπτεται εξωτερικά από ριβοσώματα και παρουσιάζει κοκκώδη μορφή (γι' αυτό άλλωστε ονομάζεται αδρό), σε αντίθεση με το λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, το οποίο αποτελείται από λείες μεμβράνες, στερείται ριβοσωματίων και εμφανίζεται χωρίς κόκκους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Netter 2008).

Τα κύτταρα συνήθως περιέχουν και τους δυο τύπους ενδοπλασματικού δικτύου. Η αναλογία τους όμως μπορεί να αλλάζει ανάλογα με τις λειτουργικές ανάγκες του κυττάρου. Το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο εντοπίζεται περιπυρηνικά, διότι οι κοιλότητες του αποτελούν συνέχεια της πυρηνικής μεμβράνης. Χαρακτηρίζεται, όπως προαναφέρθηκε από την παρουσία ριβοσωμάτων και βρίσκεται σε επικοινωνία με το σύμπλεγμα Golgi, με το οποίο συνεργάζεται για την τροποποίηση των πρωτεϊνών. Το λείο ενδοπλασματικό δίκτυο από την άλλη, είναι ένα σύστημα σωληναρίων και κυστιδίων, με ακανόνιστο σχήμα, χωρίς ριβοσώματα (Shibata 2006). Συμμετέχει στην αποτοξίνωση του κυττάρου, στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, στη σύνθεση των φωσφολιπιδίων και των στεροειδών ορμονών καθώς και στην αποθήκευση και ρύθμιση της συγκέντρωσης του ασβεστίου (Kaufman 1999, Wang et al 2014). Και τα δυο ενδοπλασματικά δίκτυα παρόλο που επικοινωνούν είναι χωροταξικά διαχωρισμένα (Shibata et al 2006).



Εικόνα 7 – Σχηματική απεικόνιση της δομής του Αδρού ενδοπλασματικού δικτύου (Rogers 2014).

7.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ ΑΔΡΟΥ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ

Το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο είναι ο χώρος που συντίθενται οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες, οι πρωτεΐνες της μεμβράνης και των λυσοσωμάτων, καθώς και ο χώρος για την κατάλληλη αναδίπλωση και τροποποίηση τους. Μέσα στον αυλό του, συντίθεται περίπου το 1/3 του συνόλου των πρωτεϊνών του κυττάρου. Στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, η πρωτεϊνσύνθεση πραγματοποιείται από τα ριβοσώματα.

Στο ΑΕΔ πραγματοποιείται και η μετά-μεταφραστική τροποποίηση, η αναδίπλωση και ο ολιγομερισμός των πρωτεϊνών (Kaufman 1999, Wang et al 2014). Η μετά-μεταφραστική τροποποίηση έχει ως στόχο τη διερεύνηση του φάσματος των λειτουργιών των πρωτεϊνών και περιλαμβάνει την φωσφορυλίωση, μεθυλίωση, υδροξυλίωση, N-συνδεδεμένη γλυκοζυλίωση, ακετυλίωση, ουβικουιτιλίωση και O-συνδεδεμένη γλυκοζυλίωση (Alberts 2014).

Η αναδίπλωση των εκκρινόμενων και μεμβρανικών πρωτεϊνών, υποβοηθείται από διάφορες πρωτεΐνες-μοριακούς συνοδούς (chaperones) και οξειδοαναγωγάσες. Οι μη-αναδιπλωμένες ή κακοδιπλωμένες πρωτεΐνες δεν συνεχίζουν την πορεία τους, αλλά κατακρατούνται στο ΑΕΔ.

Ακολουθεί η μεταφορά των περισσότερων εκκρινόμενων και μεμβρανικών πρωτεϊνών στο σύμπλεγμα Golgi, από όπου κατευθύνονται στον τελικό προορισμό τους (Kober et al 2012).

7.2 ΣΤΡΕΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ

Η κατάσταση κατά την οποία μη-αναδιπλωμένες ή λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, συσσωρεύονται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου, ορίζεται σαν στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (Aneli et al 2008).

Η διαταραχή αυτή των φυσιολογικών λειτουργιών του ενδοπλασματικού δικτύου (στρες), ενεργοποιεί ένα πολύπλοκο ενδοκυτταρικό μηχανισμό σηματοδότησης με σκοπό την επαναφορά της φυσιολογικής ομοιόστασης του οργανιδίου. Αυτός ο εξελικτικά συντηρημένος μηχανισμός ονομάζεται «απόκριση στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες-unfolded protein response-UPR». Πρόκειται για μια απόκριση επιβίωσης με σκοπό την επαναφορά της ομοιόστασης.

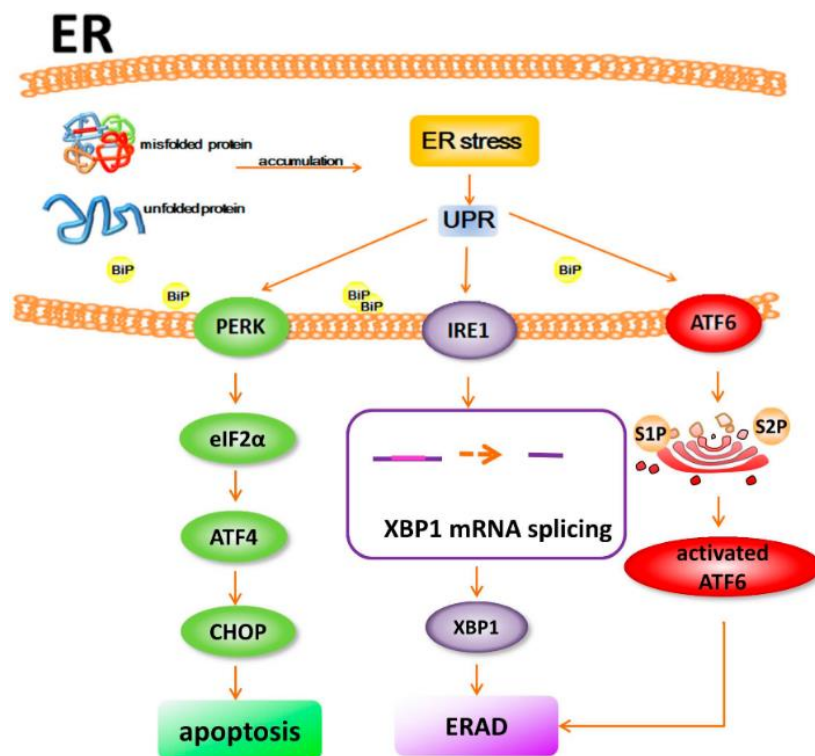
Οι κύριοι μηχανισμοί του UPR είναι:

- a) Η αναστολή της μετάφρασης με σκοπό τον περιορισμό του πρωτεϊνικού φορτίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο
- b) Η ενεργοποίηση διαφόρων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μοριακούς-συνοδούς του ενδοπλασματικού δικτύου για αύξηση της ικανότητας αναδίπλωσης.
- c) Η αύξηση του ρυθμού απομάκρυνσης των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών μέσω του συστήματος ERAD (μέρος του μηχανισμού ποιοτικού ελέγχου, ΕΔ - συνδεόμενη αποδόμηση – ER - associated degradation).

Στην περίπτωση αδυναμίας απάντησης του UPR με στόχο την επαναφορά της ομοιόστασης και των φυσιολογικών λειτουργιών του ενδοπλασματικού δικτύου, επάγεται κυτταρικός θάνατος με τη μορφή της απόπτωσης (προγραμματισμένος) (Schroder and Kaufman 2005).

Στη σωστή αναδίπλωση των εκκριτικών και των μεμβρανικών πρωτεϊνών, συνεπικουρούν πρωτεΐνες μοριακοί-συνοδοί. Αυτές είναι πρωτεΐνες, με οξειδοαναγωγική δράση, που καταλύουν το σχηματισμό και την ισομερίωση των

δισουλφιδικών δεσμών των πρωτεϊνών. Ακόμα έχουν εντοπιστεί στο ΑΕΔ, επτά πρωτεΐνες θερμικού σοκ 40s (Hsp40s - heat shock proteins). Είναι γνωστές και ως 'ERdj1-7' και αποτελούν συν-συνοδούς (co-chaperones) για τις πρωτεΐνες Hsp70s (πχ. για τη BiP - binding immunoglobulin protein). Οι ERdj1, ERdj2, ERdj4 και η ERdj7 είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, ενώ οι ERdj3, ERdj5 και η ERdj6 εντοπίζονται στον αυλό του ΑΕΔ (Otero et al 2014).



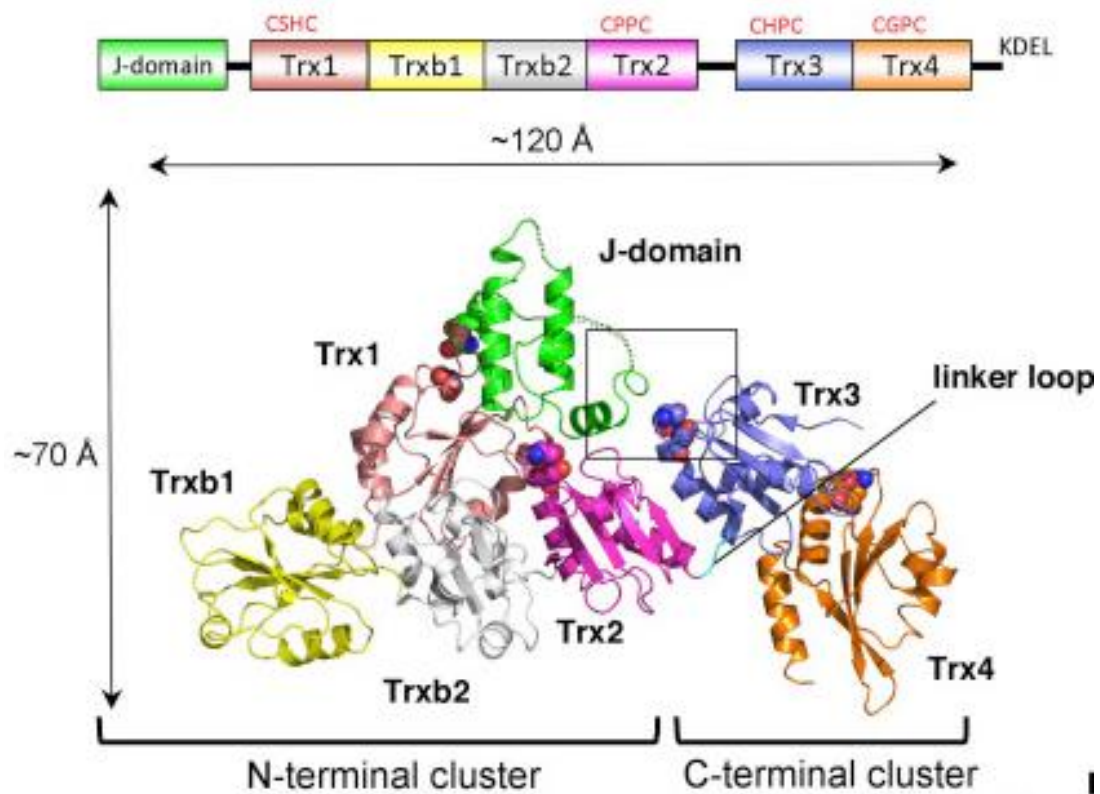
Εικόνα 8– Σχηματική αναπαράσταση των οδών μεταγωγής σήματος κατά την απόκριση UPR στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (Fan et al 2017).

8. ΠΡΩΤΕΪΝΗ ERdj5

Η ERdj5 είναι μια πρωτεΐνη (Endoplasmic reticulum - (ER) resident protein containing DNA J), γνωστή και ως DNAJC10 ή J - containing PDI-like protein - JPDI και αποτελεί μέρος της οικογένειας πρωτεϊνών δισουλφιδικής ισομεράσης. Βρίσκεται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων των θηλαστικών και κωδικοποιείται από το γονίδιο DNAJC10. Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς έχει χαρακτηριστική δομή και σημαντικό ρόλο σε περιπτώσεις στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (Hosoda et al 2003). Η ERdj5 περιέχει έξι περιοχές θειορεδοξίνης, με ενεργά CXXC μοτίβα στις τέσσερις από αυτές. Στις υπόλοιπες δυο περιοχές θειορεδοξίνης (Trxb 1-2), παρατηρείται αλληλεπίδραση με το EDEM1 (ER - Degradation Enhancing α -Mannosidase-like protein) και έτσι επιτυγχάνεται η συμμετοχή της στη διαδικασία αποδόμησης μη ορθά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών ERAD. Μεταξύ αυτών των 6 Trx περιοχών σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου και ιοντικοί δεσμοί, γεγονός που ευνοεί τη σταθεροποίηση της τεταρτοταγούς δομής της ERdj5 (Hagiwara et al 2011). Επιπλέον περιέχει μια περιοχή DnaJ στο αμινοτελικό της άκρο, γεγονός που τη βοηθά να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη BiP, η οποία αποτελεί δείκτη του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (Cunnea et al 2003).

Επιπροσθέτως, στη δομή της περιλαμβάνεται και μια περιοχή που μοιάζει με την πρωτεΐνη PDI (PDI - like protein disulfide isomerase) και έτσι συμβάλλει στο σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης, οι οποίοι κρίνονται απαραίτητοι για τη διατήρηση της ορθής τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών (Ushioda & Nagata 2011).

Η συνεισφορά της ERdj5 στη αποδόμηση των μη-αναδιπλούμενων ή των λανθασμένα αναδιπλούμενων πρωτεϊνών σε συνδυασμό με την αλληλεπίδραση της με την πρωτεΐνη BiP, αποδεικνύουν τον καθοριστικό της ρόλο στις περιπτώσεις στρες του ενδοπλασματικού δικτύου.



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση της δομής της πρωτεΐνης ERdj5 (Maegawa et al 2017).

9. ΥΛΙΚΑ ΚΑΛΥΨΗΣ ΟΔΟΝΤΙΚΟΥ ΠΟΛΦΟΥ

Η οδοντιατρική επιστήμη στις μέρες μας στοχεύει στη διατήρηση των οδοντικών ιστών καθώς και στην προστασία του συμπλέγματος οδοντίνης-πολφού. Κυρίαρχο στόχο, αποτελεί η ελάχιστη δυνατή θεραπευτική παρέμβαση, όταν αυτό είναι δυνατό.

Συγκεκριμένα, επιδιώκεται η θεραπεία του ζωντανού πολφού, μέσω της εφαρμογής παραγόντων κάλυψης, όπου υπάρχει ικανότητα αναγέννησης του συμπλέγματος οδοντίνης-πολφού. Εν συνεχεία, μέσω της εναπόθεσης επανορθωτικής οδοντίνης μπορεί να διατηρηθεί η ζωτικότητα του πολφού και να επουλωθεί. Η επίτευξη αυτής της προσέγγισης, προϋποθέτει την απουσία κλινικών συμπτωμάτων, που δηλώνουν μη αντιστρεπτή βλάβη του πολφού και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρακτική, με την τοποθέτηση ενός βιοσυμβατού υλικού προστασίας, είτε σε τερηδονικές βλάβες μεγάλου βάθους, είτε σε περιπτώσεις τραύματος, με ή χωρίς αποκάλυψη του πολφού. Στις περιπτώσεις εναπομείναντος λεπτού στρώματος οδοντίνης, υπερκειμένου του πολφού επιχειρείται «έμμεση κάλυψη» πολφού, ενώ στις περιπτώσεις αποκάλυψης επιχειρείται «άμεση κάλυψη» με τοποθέτηση βιοϋλικού απευθείας στον πολφό (Saghiri et al 2016).

Το ιδανικό υλικό προστασίας του πολφού θα πρέπει να έχει ικανότητες τέτοιες ώστε να προστατεύει τον πολφό από θερμικά, μηχανικά, χημικά, ηλεκτρικά και μικροβιακά ερεθίσματα. Συνεπώς, θα πρέπει να βελτιώνει την προσαρμογή της έμφραξης στα τοιχώματα της κοιλότητας και να προσφύεται καλά πάνω στους οδοντικούς ιστούς, να μπορεί να μειώνει ή να ελέγχει τη θερμική αγωγιμότητα, όταν στο δόντι υπάρχει μεταλλική αποκατάσταση η οποία είναι αγωγός της θερμότητας, να μην ερεθίζει τον πολφό του δοντιού, να είναι βιοσυμβατό υλικό, να έχει αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δράση, να προστατεύει τον πολφό από μηχανικά, χημικά ερεθίσματα και γαλβανικά ρεύματα, να είναι ακτινοσκιερό, να έχει ιδιότητες φυσικές ή χημικές που να προσδίδουν αντοχή στο υλικό, κάτω από την έμφραξη και να μην επηρεάζει τον πολυμερισμό ή την πήξη του υλικού της αποκατάστασης. Τέλος θα πρέπει να τοποθετείται εύκολα στην κοιλότητα και να έχει ταχεία πήξη, να μην έχει έντονη ή δυσάρεστη γεύση και να μην ερεθίζει τους οδοντικούς ιστούς, να ταιριάζει χρωματικά με τους οδοντικούς ιστούς, κυρίως στα

πρόσθια δόντια, γιατί μπορεί να παρουσιαστεί αισθητικό πρόβλημα κατά την τελική έμφραξη (Ferracane 1995, Noort 2007).

9.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΥΛΙΚΩΝ ΚΑΛΥΨΗΣ ΣΤΟ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ

ΠΟΛΦΟΥ - ΟΔΟΝΤΙΝΗΣ

9.1.1 ΥΔΡΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ ($\text{Ca}(\text{OH})_2$)

Βασικό υλικό κάλυψης του πολφού, σε διάφορες μορφές είναι το υδροξείδιο του ασβεστίου- $\text{Ca}(\text{OH})_2$, το οποίο βάση μελετών βιοσυμβατότητας αποτελεί τη χρυσή σταθερά στην οδοντιατρική για περισσότερα από 80 έτη (Dammaschke 2008). Το $\text{Ca}(\text{OH})_2$ χρησιμοποιείται για άμεση και έμμεση κάλυψη του πολφού. Μπορεί ακόμα να χρησιμοποιηθεί και ως προστατευτικό στρώμα κάτω από σύνθετες αποκαταστάσεις.

Στις επιθυμητές ιδιότητες του, συγκαταλέγονται η ταχεία πήξη του ακόμα και σε περιβάλλον υγρασίας, η μεταλλικοποίηση της οδοντίνης με τη μείωση της διαπερατότητας της καθώς και η αντιφλεγμονώδης δράση του, αφού εξουδετερώνει το όξινο pH του πολφού με φλεγμονή.

Παρόλα τα πλεονεκτήματά του, το $\text{Ca}(\text{OH})_2$ παρουσιάζει μεγάλη διαλυτότητα, μειωμένη αντοχή σε τάσεις, ενώ δημιουργεί μια νεκρωτική ζώνη που μετέπειτα γίνεται ορατή (2-3 μήνες), ως πορώδης γέφυρα οδοντίνης (δημιουργία τριτοταγούς οδοντίνης). Έχει ακόμη αναφερθεί πως έχει οδηγήσει σε φλεγμονή ή ακόμα και νέκρωση του πολφού (Shi et al 2005, Kirk et al 1989, Woehrlen et al 1977, Phaneuf et al 1968).

9.1.2. ΟΙ ΣΥΓΚΟΛΛΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Στην προσπάθεια ανεύρεσης του ιδανικού υλικού κάλυψης, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές άλλων υλικών, όπως οι συγκολλητικοί παράγοντες των σύνθετων ρητινών, λόγω του ιδιαίτερου χαρακτηριστικού της ερμητικής απόφραξης που δύνανται να προσφέρουν. Οι συγκολλητικοί παράγοντες, παρουσιάζουν ευκολία στη χρήση και το χειρισμό τους. Αποτελούνται ρητίνες που περιέχουν υδρόφιλα

μονομερή, τα οποία κατά τον πολυμερισμό τους, προσροφούν τις ίνες κολλαγόνου που παραμένουν μετά την αδροποίηση της οδοντίνης, σχηματίζοντας έτσι μια υβριδική ζώνη. Η ζώνη αυτή, σε συνδυασμό με μια μόνιμη έμφραξη σύνθετης ρητίνης, μπορεί να εξασφαλίσει άριστη προσκόλληση στα τοιχώματα της κοιλότητας, εμποδίζοντας με επιτυχία την μικροβιακή διείσδυση (Camp et al 2002, Onoe et al 1995, Ranly & Garcia-Godoy 2000, Swift et al 2003).

Για την ανοχή του πολφού στα ρητινώδη συστήματα, πραγματοποιήθηκε μια σειρά μελετών, με σκοπό την ανάδειξη των χαρακτηριστικών τους, στη χρήση τους για τη θεραπεία του ζωντανού πολφού, ως υλικά άμεσης κάλυψης (Watts and Paterson 1987). Οι κυριότεροι προβληματισμοί σχετικά με τα συστήματα συγκολλητικών παραγόντων αφορούν τη βιοσυμβατότητα τους. Τόσο το αδροποιητικό οξύ, όσο και τα συστατικά (π.χ. μονομερή) που απελευθερώνονται από το ίδιο το υλικό, φαίνεται να έχουν βλαπτική επίδραση στον πολφό, εμφανίζοντας κυτταροτοξικότητα σε *in vitro* μελέτες (Costa et al 2003, Kitasako et al 2002, Schuurs et al 2000).

Όλα τα προαναφερθέντα και τα αποτελέσματα των μελετών αυτών επηρεάζονται από το είδος του συστήματος και την τεχνική που χρησιμοποιείται για την τοποθέτηση του, καθώς είναι σχετικά με τον τύπο του υλικού και το βαθμό πολυμερισμού του (Schuurs et al 2000, Cox et al 2001, Kitasako et al 2002, Hafez et al 2002).

Η *in vivo* εφαρμογή σε πειραματόζωα και σε ανθρώπους με σκοπό την επούλωση του πολφού έδειξε εμφάνιση αντιστρεπτής φλεγμονής, μικρού βαθμού, με εναπόθεση σκληρού ιστού, σε ικανοποιητικά ποσοστά στην περιοχή της αποκάλυψης (Schuurs et al 2000, Kitasako et al 2002, Hafez et al 2002, Scarano et al 2003, Camp et al 2002). Επιπροσθέτως υπάρχουν αναφορές για σχηματισμό πιο λεπτής γέφυρας οδοντίνης, πιο ομαλής και με ηπιότερες φλεγμονώδεις αντιδράσεις σε σχέση με τα σκευάσματα $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Onoe et al 1995, Swift et al 2003).

Αντιθέτως, υπάρχουν αναφορές σε περιπτώσεις με εμφάνιση χρόνιων φλεγμονωδών αντιδράσεων, συνοδευόμενων από περιοχές με νέκρωση, μικροαποστήματα και απουσία σχηματισμού γέφυρας οδοντίνης, έπειτα από διαταραχή του στρώματος των οδοντινοβλαστών (Camp et al 2002, Ranly & Garcia-Godoy 2000, Medina et al 2002).

Η αναγεννητική ικανότητα των ιστών και των οργάνων σε μοριακό επίπεδο, αποτελεί αντικείμενο έρευνας, με σκοπό να κατανοηθούν οι πολύπλοκοι μοριακοί μηχανισμοί των φυσιολογικών, αλλά και εκείνων που αφορούν τις διαδικασίες επούλωσης των ιστών. Παράλληλα, η συνεχής ανάπτυξη των βιοϋλικών, σε συνδυασμό με την κατανόηση των προαναφερθέντων μοριακών μηχανισμών, επιτρέπουν νέες θεραπευτικές προοπτικές, λόγω αναθεώρησης πολλών παλαιότερων μεθόδων αποκατάστασης των ιστικών βλαβών. Οι επιστημονικές εξελίξεις αυτές, δε θα μπορούσαν να αφήσουν ανεπηρέαστη την οδοντιατρική επιστήμη. Συγκεκριμένα, το ενδιαφέρον ως προς τους επανορθωτικούς μηχανισμούς που ενεργοποιούνται στο σύμπλεγμα οδοντίνης-πολφού. Πολλοί από αυτούς δεν έχουν διαλευκανθεί έως σήμερα, επομένως, καταβάλλεται προσπάθεια για την κατανόηση τους, προκειμένου να αξιοποιηθούν στη θεραπεία ζωντανού πολφού. Επιπροσθέτως, πραγματοποιούνται μελέτες βιοσυμβατότητας των υλικών, που ήδη χρησιμοποιούνται, χωρίς να είναι τεκμηριωμένη η εφαρμογή τους απευθείας στον πολφό (π.χ. συγκολλητικά συστήματα σύνθετων ρητινών), αλλά και μελέτες εφαρμογής νέων παραγόντων (π.χ. αυξητικών παραγόντων), που πιθανά θα μπορούσαν να ενεργοποιήσουν ήδη υπάρχοντες εγγενείς αναγεννητικούς μηχανισμούς του πολφού.

Η Δρ. Άννα Ποιμένοβα, στη διδακτορική της διατριβή (Αθήνα 2018, Poimenova et al 2018), συνέβαλε στην διερεύνηση των προαναφερθέντων, μέσω της μελέτης των επιπτώσεων της άμεσης κάλυψης του πολφού με τρία διαφορετικά συγκολλητικά συστήματα (Prime&BondNT, Clearfil SE Bond, και Clearfil S3 Bond) και πάστα υδροξειδίου του ασβεστίου (Dycal). Σκοπός της διατριβής της ήταν ο έλεγχος της διατήρησης της ζωτικότητας του ιστού, ενώ κατέγραψε τις πρώιμες κυτταρικές αποκρίσεις του πολφού ως προς το κυτταρικό στρες και την δυνατότητα ιστικής αναγέννησης. Τα ευρήματά της, έδειξαν αλλαγές στην ιστική ακεραιότητα, την ζωτικότητα του πολφού, και την απόπτωση των κυττάρων. Τα αποτελέσματα και ο προσανατολισμός της διδακτορικής αυτής διατριβής, αποτέλεσαν εφαλτήριο για περαιτέρω μελέτη, γεγονός που μας οδήγησε στην εκπόνηση της μελέτης αυτής.

Β. Ειδικό μέρος

1. Σκοπός

Με βάση την υπάρχουσα γνώση, η παρούσα διπλωματική εργασία, έχει ως σκοπό, να ερευνήσει περεταίρω τις πρώιμες κυτταρικές αποκρίσεις του πολφού και τις επιπτώσεις των τριών διαφορετικών συγκολλητικών συστημάτων Prime&BondNT, Clearfil SE Bond, και Clearfil S3 Bond, καθώς και της πάστας του υδροξειδίου του ασβεστίου (Dycal), έπειτα από την άμεση κάλυψη του από αυτούς.

Για την διερεύνηση των αποκρίσεων αυτών, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική εντόπιση τεσσάρων διαφορετικών πρωτεϊνών – δεικτών, με σκοπό την εντοπισή τους, την ημιποσοτική ανάλυση τους και τη σύγκριση τους με ευρήματα προηγούμενων εργασιών.

2. Υλικά και Μεθοδολογία

2.1. Προέλευση δειγμάτων

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη (τομές κρυοτόμου από πολφό ανθρώπινων δοντιών) προήλθαν από τη συλλογή δειγμάτων της διδακτορικής διατριβής Δρ. Άννας Ποιμένοβα (Αθήνα 2018).

Ακολουθεί σύντομη περιγραφή της διαδικασίας που πραγματοποιήθηκε για τη συλλογή και πειραματική επεξεργασία των δειγμάτων στα πλαίσια της διατριβής της Δρ. Άννας Ποιμένοβα:

1. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η συλλογή 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).
2. Αμέσως μετά την εξαγωγή, τα δόντια τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα κωνικά σωληνάρια των 50mL (falcon) που περιείχαν θρεπτικό διάλυμα 'μεταφοράς' [DPBS (0.9mM CaCl_2 , 0.5mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.7mM KCl , 1.47mM KH_2PO_4 , 137,93mM NaCl , 8.06mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Penstrep 3%, και Fungizone 0.3% (Gibco™, Life Technologies Ltd, UK)].
3. Σε κάθε δόντι πραγματοποιήθηκαν 3-4 οβελιαίες συνεχείς τομές με παρειο-γλωσσική 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.
4. Αμέσως μετά την κοπή, οι τομές μεταφέρονταν στο χώρο της κυτταροκαλλιέργειας, μέσα σε αποστειρωμένα falcon, με ίδιας σύνθεσης με το προαναφερθέν, φρέσκο διάλυμα 'μεταφοράς'.
5. Σε συνθήκες αποστείρωσης και εντός της απαγωγού εστίας των κυτταροκαλλιιεργειών, οι τομές ξεπλένονταν με το φρέσκο διάλυμα 'μεταφοράς' και διαμοιράζονταν τυχαία σε πέντε ομάδες (4 πειραματικές και 1 ελέγχου) όπως φαίνεται στον Πίνακα 1. Εκεί εφαρμόζονταν με εντριπτήρα συγκολλητικού

συστήματος extra fine (TPC Advanced Technology, Inc, City of Industry, CA), τα 3 συγκολλητικά συστήματα (Prime&BondNT, Clearfil SE Bond, και Clearfil S3 Bond) απευθείας στον πολφό, ενώ το Dycal εφαρμοζόταν με το εργαλείο τοποθέτησης υδροξειδίου ασβεστίου (εργαλείο Dycal). Ο πολυμερισμός γινόταν με λυχνία LED (Radii Plus, SDI Limited, Victoria, Australia) (φάσμα εκπομπής: 440-480nm, 1500mW/cm², σε συνεχή ένταση). Όσον αφορά την 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. Στην ομάδα ελέγχου, 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 (GibcoTM, Life Technologies Ltd, UK)].

6. 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 CO₂, 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.
7. Μετά το πέρας της καλλιέργειας, όλες οι τομές των δοντιών μονιμοποιούνταν σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεΰδης (PFA) (50ml ανά τομή) για 48 ώρες, σε θερμοκρασία 4°C. Ακολουθούσε ξέπλυμα σε τρεχούμενο νερό για 2 ώρες.
8. Οι τομές των 750μm υποβάλλονταν σε μια διαδικασία κρυοπροστασίας, σε διάλυμα σακχαρόζης 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 MediumTM, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) με εμβύθιση σε ισοπεντάνιο -20°C. Οι κύβοι που προκύπτανε κόβονταν σε συνεχόμενες τομές πάχους 15μm σε

κρυοτόμο (Leica CM1950; Leica, Wetzlar, Germany), που στη συνέχεια φυλάσσονταν στους -80oC μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Πίνακας 1. Οι ομάδες παραγόντων που χρησιμοποιήθηκαν και η σύνθεση αυτών.

Ομάδες παραγόντων που χρησιμοποιήθηκαν	Σύνθεση
ΟΜΑΔΑ 1 DPBS (Control, ομάδα ελέγχου)	2.7mM KCl, 1.5mM KH ₂ PO ₄ , 137.9mM NaCl, 8mM Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O
ΟΜΑΔΑ 2 Prime&Bond	Δι- και τριμεθακρυλικές ρητίνες, HEMA, PENTA, άμορφο διοξείδιο του πυριτίου, φωτοενεργοποιητές, σταθεροποιητές, υδροφθορική κετυλαμίνη, ακετόνη
ΟΜΑΔΑ 3 Clearfil SE	BisGMA, HEMA, 10-MDP, υδρόφοβο αλειφατικό μεθακρυλικό, κολλοειδές πυρίτιο, φωτοενεργοποιητές καμφοροκινόνης, επιταχυντές, νερό
ΟΜΑΔΑ 4 Clearfil S3	BisGMA, HEMA, 10-MDP, αιθανόλη, φθοριούχο νάτριο, υδρόφιλο αλειφατικό διμεθακρυλικό, υδρόφοβο αλειφατικό μεθακρυλικό, κολλοειδές πυρίτιο, φωτοενεργοποιητές καμφοροκινόνης, επιταχυντές, νερό
ΟΜΑΔΑ 5 Dycal	Πάστα βάσης: 1,3 βουτυλενο-1-γλυκολ-διακυλικό οξύ, οξείδιο ψευδαργύρου, φωσφορικό ασβέστιο βολβραμιούχο ασβέστιο, οξείδιο σιδήρου, χρωστικές οξειδίου του σιδήρου Πάστα καταλύτη: υδροξείδιο του ασβεστίου, N-αιθυλ-ο/p-τολουολοσουλφοναμίδιο, οξείδιο ψευδαργύρου, διοξείδιο τιτανίου, στεατικός ψευδάργυρος, χρωστικές οξειδίου του σιδήρου

2.2. Ανοσοϊστοχημεία

Η τεχνική της ανοσοϊστοχημείας αποτελεί διαδικασία εντοπισμού πρωτεϊνών σε τομές ιστών, βασιζόμενη στην αρχή της ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων στα αντιγόνα. Αποτελεί μια *in situ* μορφή ημιποσοτικής ανίχνευσης πρωτεϊνών η οποία βρίσκει ποικίλες εφαρμογές στην έρευνα.

Στην παρούσα εργασία έγινε ανοσοϊστοχημεία στις τομές κρυοτόμου από τις πέντε ομάδες της μελέτης της Δρ Α. Ποιμένοβα (1-control/DPBS, 2-Prime and Bond , 3-Clearfill SE , 4-Clearfill S3 , 5-Dycal), που προέκυψαν όπως περιγράφηκε στο 2.1. Σε κάθε ανοσοϊστοχημεία για καθένα από τα πρωτογενή αντισώματα συμπεριελήφθησαν 2-3 πλακίδια από κάθε ομάδα. Κάθε πλακίδιο (αντικειμενοφόρος) έφερε τρεις τομές.

Τα ειδικά (πρωτογενή) αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία είναι αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών-αντιγόνων: OPN (osteopontin-οστεοποντίνη), DSP (dentin sialoprotein-οδοντινική σιαλοπρωτεΐνη), DNAJ10 /ERdj5 (Endoplasmic reticulum - (ER) resident protein containing DNA J), TRXR1 (thioredoxin reductase 1-αναγωγάση 1 της θειορεδοξίνης) (Πίνακας 2).

Για την ανοσοϊστοχημική εντόπιση του κάθε αντιγόνου ακολουθήθηκε πρωτόκολλο διάρκειας δυο ημερών. Αναλυτικά:

1^η ημέρα

1. Μεταφορά των πλακιδίων από την θερμοκρασία φύλαξής των (-65° C) σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.
2. Πλύση των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα TBST (Tris-buffered saline με 0,4% Triton X 100) ,για 5 min.
3. Περιχαράκωση τομών με DAKO pen.
4. Επώαση των τομών σε διάλυμα αποκλεισμού/παρεμπόδισης (Blocking solution) το οποίο αποτελείτο από 10 % Normal Goat serum (NGS, DAKO Glostrup, Denmark), διαλυμένο σε TBST (TBS +Triton 0,4%), για 60 min.
5. Επώαση των τομών με τα πρωτογενή αντισώματα τα οποία ήταν αραιωμένα σε TBST+ 10% NGS ,για μια νύχτα (overnight) σε θερμοκρασία 4° C και σε περιβάλλον υγρασίας.

Πίνακας 2. Πρωτογενή αντισώματα

Αντίσωμα	Είδος αντισώματος	Ζώο έγερσης αντισώματος	Εταιρεία παραγωγής	Αραίωση αντισώματος στη διαδικασία
OPN	πολυκλωνικό	κουνέλι	Spring-Bioscience	1:100
DSP	μονοκλωνικό	ποντίκι	Santa-Cruz	1:50
DNAJ10 /ERDJ5	πολυκλωνικό	κουνέλι	Santa-Cruz	1:100
TRXR1	μονοκλωνικό	ποντίκι	Santa-Cruz	1:100

2^η ημέρα

1. Επαναφορά των πλακιδίων σε θερμοκρασία δωματίου ,για 15 min.
2. Πλύσιμο των τομών σε διάλυμα TBS για 5 min x 3 φορές ,για να απομακρυνθεί το πρωτογενές αντίσωμα.
3. Επώαση με τα δευτερογενή αντισώματα τα οποία ήταν αραιωμένα σε TBS+ 2% NGS (βλέπε πίνακα 3), για 120 min σε θερμοκρασία δωματίου και σε περιβάλλον υγρασίας.

Πίνακας 3. Δευτερογενή αντισώματα.

Αντίσωμα (biotin conjugated)	Ζώο έγερσης αντισώματος	Εταιρεία παραγωγής	Αραίωση αντισώματος στην διαδικασία
Έναντι των πρωτογενών OPN και DNAJ10 /ERDJ5 που έχουν παραχθεί σε κουνέλι	κατσίκι	Dako	1:400
Έναντι πρωτογενών DSP και TRXR1 που έχουν παραχθεί σε ποντίκι	κατσίκι	Millipore	1:500

4. Πλύσιμο των τομών σε διάλυμα TBS ,για 5 min x 3 φορές, για να απομακρυνθεί το δευτερογενές αντίσωμα.
6. Επώαση των τομών με το σύμπλεγμα Αβιδίνης - Βιοτίνης - Υπεροξειδάσης / AB Complex (ABC kit , Vector Laboratories Ltd , Peterborough , UK), για 30 min ,σε θερμοκρασία δωματίου και σε περιβάλλον υγρασίας.
5. Πλύσιμο των τομών σε διάλυμα TBS ,για 5 min x 3 φορές, για να απομακρυνθεί το AB Complex.
6. Επώαση με το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης DAB (διαμινοβενζιδίνη) σε TBS και H_2O_2 , με σκοπό την ενζυμική ανίχνευση της ανοσοχρώσης. Η DAB παρουσία H_2O_2 οξειδώνεται από την υπεροξειδάση σε προϊόν με καφέ χρώμα.
7. Συμπληρωματική χρώση(Counterstaining) με αιματοξυλίνη. Σε κάθε ανοσοιστοχημεία επιλεγμένες τομές επιδέχονταν συμπληρωματική χρώση για περίπου 1 min και έπειτα πλύση σε λεκάνη με τρεχούμενο νερό βρύσης για 5min.
8. Σταδιακή αφυδάτωση τομών σε αιθανόλες προοδευτικά αυξανόμενης συγκέντρωσης (70%, 80%, 90% ,100%).
9. Διαύγαση σε ξυλόλη, για 6 min x 2 φορές.
10. Τοποθέτηση καλυπτρίδας με χρήση ειδικής ρητίνης (Entellan, Merck, Darmstadt, Germany).

Η παρατήρηση των πλακιδίων έγινε σε οπτικό μικροσκόπιο (Leica DM LS2 Leica Microsystems, Wetzlar , Germany).

2.3. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ

Για την ποσοτικοποίηση της ανοσοϊστοχημείας χρησιμοποιήθηκαν ψηφιακές φωτογραφίες. Η φωτογράφιση πλακιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοϊστοχημεία έγινε στο μικροσκόπιο συμπαρατήρησης (Leica M80, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) και ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής (Leica DFC 295, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany με μεγέθυνση αντικειμενικών φακών 20x) στο Εργαστήριο Ιστολογίας –Εμβρυολογίας της Ιατρικής σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Επιλέχθηκαν τομές από όλες τις ομάδες (control, prime and bond, Clearfil SE, Clearfil S3, Dycal). Φωτογραφήθηκαν τρεις διαφορετικές περιοχές σε κάθε τομή.

Πιο συγκεκριμένα:

- (a) η περιοχή της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (περιοχή εφαρμογής παραγόντων στις ομάδες ενδιαφέροντος)
- (b) η περιοχή πέριξ της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (όμορα των περιοχών εφαρμογής των παραγόντων)
- (c) η περιοχή του πολφού

Η ποσοτικοποίηση του σήματος της ανοσοϊστοχημείας (οπτική πυκνότητα) έγινε με το λογισμικό Image J (version 1.45, NIH, Bethesda, MD, USA). Χρησιμοποιήθηκε όλο το εμβαδόν των φωτογραφιών των ομάδων (control, prime and bond, Clearfil SE, Clearfil S3, Dycal). Η μέτρηση οπτικής πυκνότητας (O.D) πραγματοποιήθηκε σε κλίμακα άσπρου – μαύρου και ταυτόχρονα μετρήθηκε το συνολικό εμβαδόν (area).

Επειδή το απόλυτο λευκό (total white) του προγράμματος παίρνει τιμή 255, ο υπολογισμός της πραγματικής τιμής της οπτικής πυκνότητας (corrected mean) προκύπτει έπειτα από αφαίρεση της αρχικής μέτρησης από το απόλυτο λευκό (255-O.D). Η νέα διορθωμένη τιμή O.D πολλαπλασιαζόμενη με το συνολικό εμβαδόν δίνει την ενσωματωμένη πυκνότητα (integrated density) που χρησιμοποιήθηκε στη στατιστική ανάλυση.

2.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS (IBM SPSS Statistics version 21, Armonk, NY, USA).

Σε μια νέα καρτέλα του προγράμματος SPSS , δημιουργούμε δυο στήλες . Στη μια στήλη καταγράφονται οι ομάδες (GROUPS) που παίρνουν μέρος στην ανάλυση και στην άλλη η εκάστοτε μεταβλητή που θα μετρηθεί (επίπεδα των DSP, OPN, ERDJ5, TRXR1). Η στήλη GROUP αποτελεί την ανεξάρτητη μεταβλητή (independent variant) ενώ η στήλη για την εκάστοτε πρωτεΐνη αποτελεί την εξαρτημένη μεταβλητή (dependent variant-scale).

Στη στήλη «GROUP» οι τιμές από 1-5 αντιστοιχίζονται με τις ομάδες (control-DPBS, Prime and Bond, Clearfill SE , Clearfill S3, Dycal) και στη στήλη της εξαρτημένης μεταβλητής θα εισαχθούν οι τελικές τιμές από την ποσοτικοποίηση του σήματος της ανοσοϊστοχημείας (*Corrected Integrated Density*) κάθε ομάδας.

Πρώτα πραγματοποιείται η περιγραφική στατιστική (descriptive statistics) για τον έλεγχο κανονικότητας της κατανομής των μετρήσεων. Οι επιλογές που ακολουθούνται είναι:

Analyse - descriptive statistics - explore - dependent list (e.g. ERDJ5), factor list (GROUP)-OK.

Στο αποτέλεσμα output του προγράμματος εμφανίζονται τα πρώτα αποτελέσματα. Σημαντικό βοήθημα για την περαιτέρω ανάλυση μας αποτελεί το θηκόγραμμα (box plot) που εμφανίζεται. Σε αυτό φαίνεται αν υπάρχουν outliers, τιμές δηλαδή που παρεκκλίνουν από την κανονική κατανομή, τις οποίες μπορούμε να επιλέξουμε αν θα τις κρατήσουμε ή όχι. Επιτρέπεται να αφαιρεθούν τα outliers. Τα outliers εμφανίζονται στο γράφημα ως αστερίσκοι (επιβεβαιωμένα παρεκκλίνουσες τιμές) ή κύκλοι (πιθανώς παρεκκλίνουσες τιμές) με έναν αριθμό. Ο αριθμός αυτός αντιστοιχεί στη θέση της αρχικής λίστας τιμών στο πρόγραμμα.

Ακολουθεί η ανάλυση διακύμανσης κατά μια μεταβλητή (one way Analysis of Variance, ANOVA) που πραγματοποιείται με σκοπό τον έλεγχο στατιστικά σημαντικής επίπτωσης της ανεξάρτητης μεταβλητής στη εξαρτημένη.

Στο πρόγραμμα: analyse - general linear model – univariate

Όπου: dependent variant – e.g. ERDJ5

Fixed factor: GROUP

Μελετώντας αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται ο βαθμός ελευθερίας (df=degrees freedom), η συχνότητα (F=frequency), και η τιμή του p value. Η στατιστική σημαντικότητα ορίζεται για τιμές $p \leq 0,05$. Ακολουθεί μετά-ανάλυση (post hoc ανάλυση) για σύγκριση των ομάδων μεταξύ τους. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το τεστ LSD (least square differences).

Από το πρόγραμμα υπολογίζονται και οι μέσοι όροι των ομάδων. Στο πρόγραμμα: analyse- compare means- means (για την εξαρτημένη μεταβλητή)

Dependent list: e.g. ERDJ5

Independent list: GROUP και στην επιλογή.

OPTIONS: Mean, number of cases , Standard Deviation , Standard Error of Means.

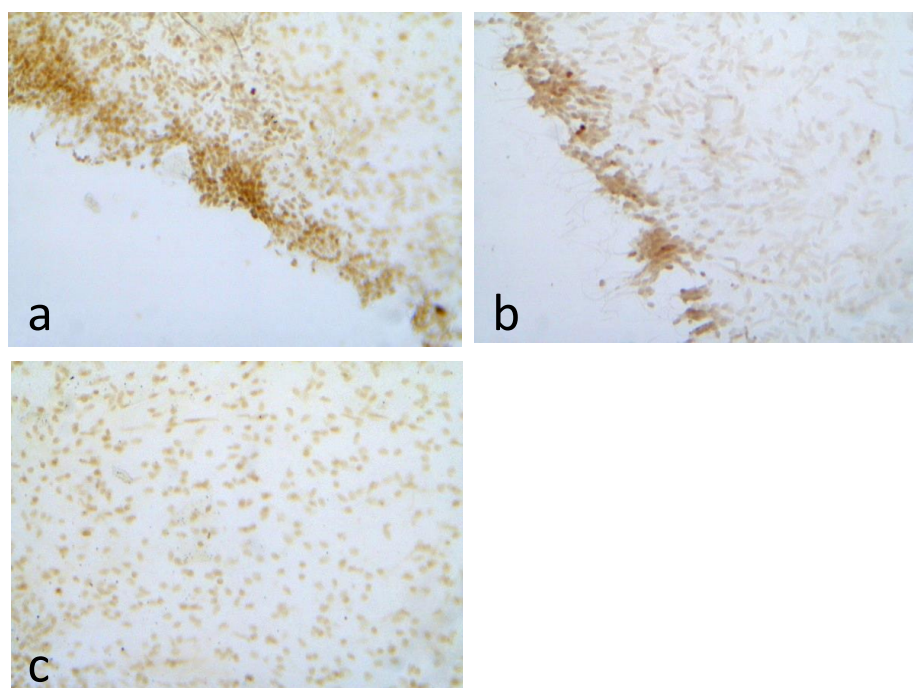
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψαν, κατά περίπτωση, στατιστικά σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα των πρωτεϊνών OPN, DSP, DNAJ10 /ERdj5, TRXR1 είτε μεταξύ των ομάδων ή με την ομάδα ελέγχου.

3.1. ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ OPN

Οι αλλαγές στα επίπεδα της OPN περιγράφονται πρώτα για το σύνολο του πολφού όπως προέκυψε από την ποσοτικοποίηση και την ανάλυση οπτικών πεδίων που περιελάμβαναν χαρακτηριστικές περιοχές του πολφού. Οι περιοχές αυτές ήταν :

- (a) η περιοχή της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης(περιοχή εφαρμογής παραγόντων στις ομάδες ενδιαφέροντος)
- (b) η περιοχή πέριξ της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (όμορα των περιοχών εφαρμογής των παραγόντων)
- (c) η κεντρική περιοχή του πολφού.



Εικόνα 10. Ενδεικτικές εικόνες μικροσκοπίου που χρησιμοποιήθηκαν στην ποσοτικοποίηση της ανοσοϊστοχημείας για τα επίπεδα της **OPN** (a) η περιοχή της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης(περιοχή εφαρμογής παραγόντων στις ομάδες ενδιαφέροντος), (b) η περιοχή πέριξ της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (όμορα των περιοχών εφαρμογής των παραγόντων)(c) η κεντρική περιοχή του πολφού.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 4 (που προέκυψε από την ANOVA στο πρόγραμμα SPSS) η τοποθέτηση των παραγόντων στον πολφό είχε στατιστικά σημαντική επίπτωση στα επίπεδα της πρωτεΐνης OPN ($p < 0,0001$).

Πίνακας 4.

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: OPN					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2.668E+15 ^a	4	6.670E+14	24.257	.000
Intercept	8.339E+17	1	8.339E+17	30324.081	.000
GROUP	2.668E+15	4	6.670E+14	24.257	.000
Error	4.125E+14	15	2.750E+13		
Total	9.707E+17	20			
Corrected Total	3.081E+15	19			

a. R Squared = .866 (Adjusted R Squared = .830)

Η μετά-ανάλυση (post hoc analysis) έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της OPN τόσο στη σύγκριση όλων των ομάδων ως προς την ομάδα 1-control, όσο και στη σύγκριση μεταξύ των ομάδων (βλέπε πίνακα 5). Όλες οι πειραματικές ομάδες παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα συγκριτικά με την ομάδα 1-control. Συγκεκριμένα : $p < 0,0001$ για την ομάδα 2 (Prime and Bond), $p < 0,0001$ για την ομάδα 3 (Clearfill SE), $p < 0,0001$ για την ομάδα 4 (Clearfill S3) και $p = 0,003$ για την ομάδα 5 (Dycal). Επιπρόσθετα η πειραματική ομάδα 4 παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα συγκριτικά με την ομάδα 2 ($p = 0,037$), την ομάδα 3 ($p = 0.001$) και την ομάδα 5 ($p < 0,0001$). Τέλος η πειραματική ομάδα 2 παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα συγκριτικά με την ομάδα 5 ($p = 0,011$). Οι μέσοι όροι, το πλήθος, η σταθερή υπόκλιση και το σταθερό σφάλμα εμφανίζονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 5.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: OPN

LSD

(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-25408000.0*	3708025.458	.000	-33311469.18	-17504530.82
	3	-18336000.0*	3027590.109	.000	-24789155.56	-11882844.44
	4	-36384000.0*	4281658.993	.000	-45510140.12	-27257859.88
	5	-12992000.0*	3708025.458	.003	-20895469.18	-5088530.82
2	1	25408000.00*	3708025.458	.000	17504530.82	33311469.18
	3	7072000.00	3708025.458	.076	-831469.18	14975469.18
	4	-10976000.0*	4787040.283	.037	-21179334.83	-772665.17
	5	12416000.00*	4281658.993	.011	3289859.88	21542140.12
3	1	18336000.00*	3027590.109	.000	11882844.44	24789155.56
	2	-7072000.00	3708025.458	.076	-14975469.18	831469.18
	4	-18048000.0*	4281658.993	.001	-27174140.12	-8921859.88
	5	5344000.00	3708025.458	.170	-2559469.18	13247469.18
4	1	36384000.00*	4281658.993	.000	27257859.88	45510140.12
	2	10976000.00*	4787040.283	.037	772665.17	21179334.83
	3	18048000.00*	4281658.993	.001	8921859.88	27174140.12
	5	23392000.00*	4787040.283	.000	13188665.17	33595334.83
5	1	12992000.00*	3708025.458	.003	5088530.82	20895469.18
	2	-12416000.0*	4281658.993	.011	-21542140.12	-3289859.88
	3	-5344000.00	3708025.458	.170	-13247469.18	2559469.18
	4	-23392000.0*	4787040.283	.000	-33595334.83	-13188665.17

Based on observed means.

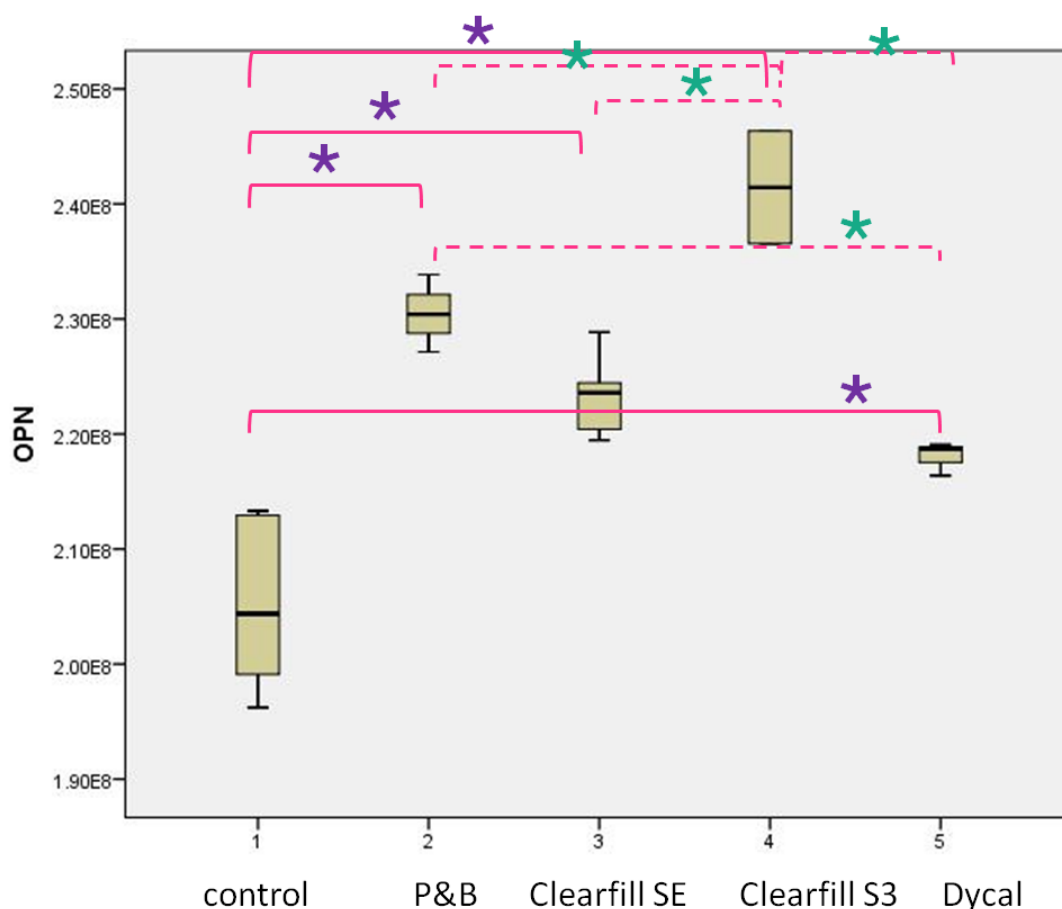
The error term is Mean Square(Error) = 27498905600000.000.

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Πίνακας 6.

OPN				
Ομάδες	Mean	N	Std.Deviation	Std. Error of Mean
1	205056000	6	7507175	3064792
2	230464000	3	3360457	1940161
3	223392000	6	3344880	1365542
4	241440000	2	6923990	4896000
5	218048000	3	1453801	839352,1

Τα συνολικά επίπεδα της OPN για όλες τις ομάδες παρουσιάζονται στην εικόνα 11.



Εικόνα 11. Θηκόγραμμα (box plot) των συνολικών επιπέδων της OPN στον πολφό. Στον κατακόρυφο άξονα εμφανίζονται οι τιμές της σχετικής πυκνότητας της ανοσοϊστοχημικής χρώσης. Στον οριζόντιο άξονα εμφανίζονται οι ομάδες: 1) control-DPBS, 2) Prime and Bond, 3) Clearfill SE, 4) Clearfill S3, 5) Dycal. Η οριζόντια μαύρη γραμμή εντός του κάθε ορθογώνιου παραλληλόγραμμου αντιστοιχεί στη διάμεσο της κατανομής. Το πάνω όριο της κατακόρυφης γραμμής που διατρέχει το κάθε ορθογώνιο παραλληλόγραμμο αντιστοιχεί στην μέγιστη τιμή της κατανομής και το κάτω όριο στην ελάχιστη. Όπου *, * - στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ δυο ομάδων με $p < 0,05$. Οι συνεχείς αγκύλες και ο μοβ αστερίσκος (*) υποδεικνύουν τη διαφορά ανάμεσα στις πειραματικές ομάδες και την ομάδα 1-control. Οι διακεκομμένες αγκύλες και ο πράσινος αστερίσκος (*) υποδεικνύουν τη διαφορά μεταξύ δυο πειραματικών ομάδων.

Συμπερασματικά τα επίπεδα της OPN όλων των πειραματικών ομάδων αυξάνονται σε σχέση με την ομάδα 1-control. Μεταξύ των πειραματικών ομάδων, η αύξηση είναι μεγαλύτερη υπό την επίδραση του παράγοντα 4 (Clearfill S3) και ακολουθούν οι ομάδες 2 (Prime and Bond), 3 (Clearfill SE) και 5 (Dycal).

Για να διερευνηθεί κατά πόσο οι επιπτώσεις που ανιχνεύτηκαν στο σύνολο του πολφού είναι ίδιες με αυτές στην οδοντινοβλαστική στοιβάδα, έγινε στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων μόνο για τις περιοχές (a) περιοχή της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (περιοχή εφαρμογής παραγόντων στις ομάδες ενδιαφέροντος) και (b) περιοχή πέριξ της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (όμορα των περιοχών εφαρμογής των παραγόντων).

Σε αυτήν την περίπτωση, όπως φαίνεται στον πίνακα 7, η τοποθέτηση των παραγόντων στον πολφό είχε στατιστικά σημαντική επίπτωση στα επίπεδα της πρωτεΐνης OPN ($p = 0,001$ Πίνακας 7).

Πίνακας 7.

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: OPN					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1,253E+15 ^a	3	4,175E+14	16,251	,001
Intercept	5,129E+17	1	5,129E+17	19961,591	,000
GROUP	1,253E+15	3	4,175E+14	16,251	,001
Error	2,055E+14	8	2,569E+13		
Total	5,686E+17	12			
Corrected Total	1,458E+15	11			

a. R Squared = ,859 (Adjusted R Squared = ,806)

Η μετά-ανάλυση (post hoc analysis) έδειξε πάλι στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της OPN στις πειραματικές ομάδες 2 (Prime and Bond, $p < 0,0001$), 3 (Clearfill SE, $p = 0,001$) και 5 (Dycal, $p = 0,015$) συγκριτικά με την ομάδα 1-control, ενώ η ομάδα 4 (Clearfill S3) δεν συμπεριλήφθηκε για τεχνικούς λόγους. Στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της OPN παρατηρήθηκε ανάμεσα στις ομάδες 2 και 5, με την ομάδα 2 να έχει πάλι αυξημένα επίπεδα OPN ως προς την 5 ($p = 0,022$) (βλέπε πίνακα 8).

Οι μέσοι όροι, το πλήθος, η σταθερή απόκλιση και το σταθερό σφάλμα εμφανίζονται στον πίνακα 9.

Πίνακας 8.**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: OPN

LSD

(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-27888000,0 [*]	4389737,122	,000	-38010751,96	-17765248,04
	3	-18768000,0 [*]	3584205,351	,001	-27033192,36	-10502807,64
	5	-13488000,0 [*]	4389737,122	,015	-23610751,96	-3365248,04
2	1	27888000,00 [*]	4389737,122	,000	17765248,04	38010751,96
	3	9120000,00	4389737,122	,071	-1002751,96	19242751,96
	5	14400000,00 [*]	5068831,818	,022	2711252,87	26088747,13
3	1	18768000,00 [*]	3584205,351	,001	10502807,64	27033192,36
	2	-9120000,00	4389737,122	,071	-19242751,96	1002751,96
	5	5280000,00	4389737,122	,263	-4842751,96	15402751,96
5	1	13488000,00 [*]	4389737,122	,015	3365248,04	23610751,96
	2	-14400000,0 [*]	5068831,818	,022	-26088747,13	-2711252,87
	3	-5280000,00	4389737,122	,263	-15402751,96	4842751,96

Based on observed means.

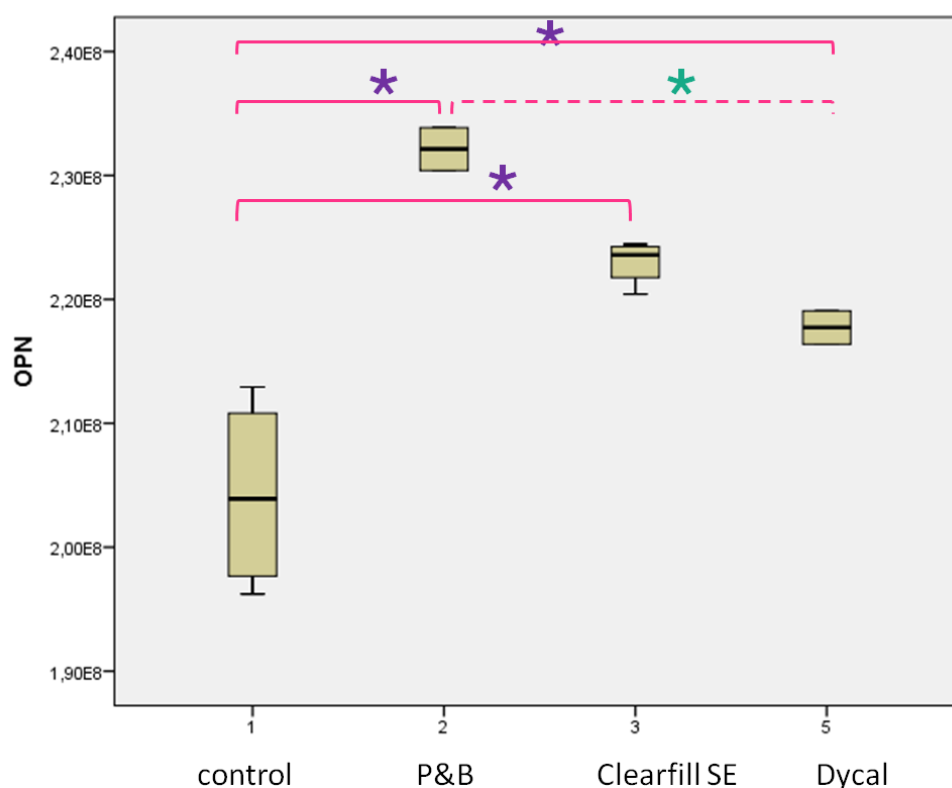
The error term is Mean Square(Error) = 25693056000000,000.

*. The mean difference is significant at the 0,05 level.

Πίνακας 9.

OPN				
Ομάδες	Mean	N	Std.Deviation	Std. Error of Mean
1	2,04E+08	4	7507175	3937463
2	2,32E+08	2	3360457	1728000
3	2,23E+08	4	3344880	909047,9
5	2,18E+08	2	1453801	1344000

Τα επίπεδα της OPN στην οδοντινοβλαστική στοιβάδα (περιοχές a+b) για όλες τις ομάδες εμφανίζονται στην εικόνα 12.



Εικόνα 12. Θηκόγραμμα (box plot) των επιπέδων της OPN στην οδοντινοβλαστική στοιβάδα(περιοχές a+b). Στον κατακόρυφο άξονα εμφανίζονται οι τιμές της σχετικής πυκνότητας της ανοσοϊστοχημικής χρώσης. Στον οριζόντιο άξονα εμφανίζονται οι ομάδες: 1) control-DPBS , 2) Prime and Bond , 3) Clearfill SE, 5) Dycal .Η οριζόντια μαύρη γραμμή εντός του κάθε ορθογώνιου παραλληλόγραμμου αντιστοιχεί στη διάμεσο της κατανομής. Το πάνω όριο της κατακόρυφης γραμμής που διατρέχει το κάθε ορθογώνιο παραλληλόγραμμο αντιστοιχεί στην μέγιστη τιμή της κατανομής και το κάτω όριο στην ελάχιστη. Όπου *,* - στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ δυο ομάδων με $p < 0,05$. Οι συνεχείς αγκύλες και ο μοβ αστερίσκος(*) υποδεικνύουν τη διαφορά ανάμεσα στις πειραματικές ομάδες και την ομάδα 1-control . Οι διακεκομμένες αγκύλες και ο πράσινος αστερίσκος(*) υποδεικνύουν τη διαφορά μεταξύ δυο πειραματικών ομάδων .

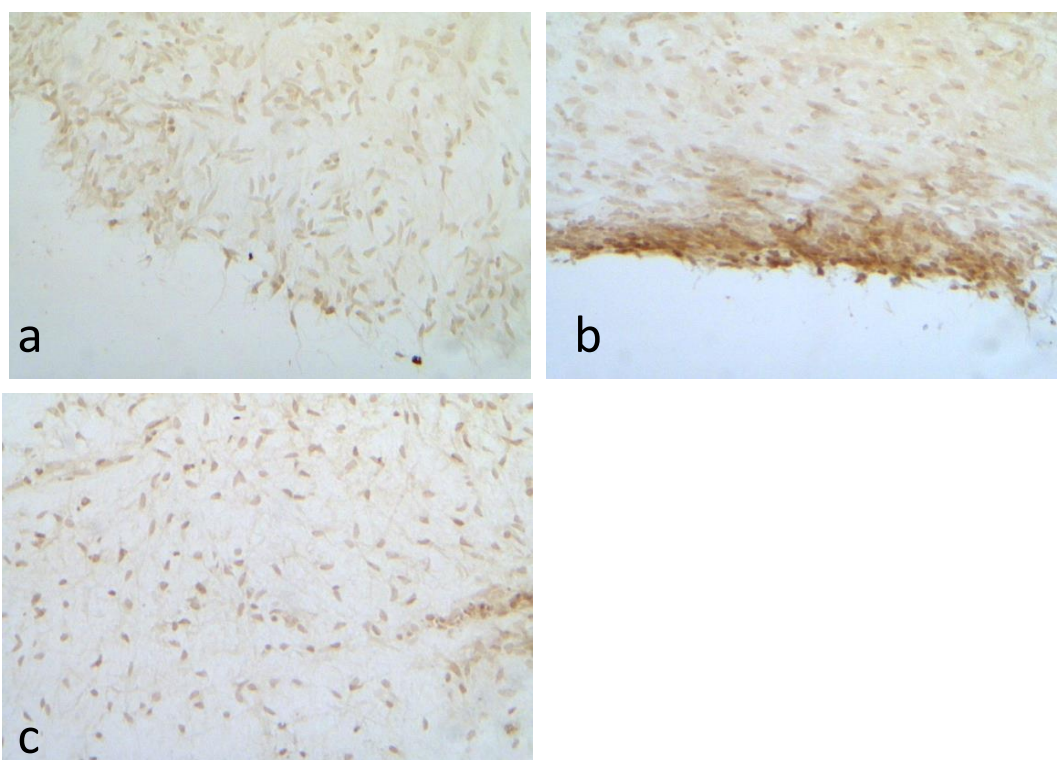
Συμπερασματικά τα επίπεδα της OPN στην οδοντινοβλαστική στοιβάδα ακολουθούν το ίδιο πρότυπο με αυτά στον συνολικό πολφό: αυξάνονται για τις πειραματικές ομάδες 2 (Prime and Bond),3 (Clearfill SE) και 5 (Dycal) σε σχέση με την ομάδα 1-control. Μεταξύ των πειραματικών ομάδων, αύξηση παρατηρήθηκε μόνο

στα επίπεδα της ομάδας 2 (Prime and Bond) ως προς την ομάδα 5 (Dycal), καθώς η ομάδα 4 (Clearfill S3) δεν συμπεριλήφθηκε για τεχνικούς λόγους στη στατιστική.

3.2. ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ DSP

Οι αλλαγές στα επίπεδα της DSP περιγράφονται πρώτα για το σύνολο του πολφού όπως προέκυψε από την ποσοτικοποίηση και την ανάλυση οπτικών πεδίων που περιελάμβαναν χαρακτηριστικές περιοχές του πολφού. Οι περιοχές αυτές ήταν :

- (a) η περιοχή της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (περιοχή εφαρμογής παραγόντων στις ομάδες ενδιαφέροντος)
- (b) η περιοχή πέριξ της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (όμορα των περιοχών εφαρμογής των παραγόντων)
- (c) η κεντρική περιοχή του πολφού.



*Εικόνα 13: Ενδεικτικές εικόνες μικροσκοπίου που χρησιμοποιήθηκαν στην ποσοτικοποίηση της ανοσοϊστοχημείας για τα επίπεδα της **DSP** (a) η περιοχή της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης(περιοχή εφαρμογής παραγόντων στις ομάδες ενδιαφέροντος), (b) η περιοχή πέριξ της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (όμορα των περιοχών εφαρμογής των παραγόντων), (c) η κεντρική περιοχή του πολφού.*

Όπως φαίνεται στον πίνακα 10 που προέκυψε από την ANOVA στο πρόγραμμα SPSS) η τοποθέτηση των παραγόντων στον πολφό δεν είχε στατιστικά σημαντική επίπτωση στα επίπεδα της πρωτεΐνης DSP ($p = 0,255$).

Πίνακας 10.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: DSP

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5,136E+14 ^a	4	1,284E+14	1,414	,255
Intercept	5,865E+17	1	5,865E+17	6460,824	,000
GROUP	5,136E+14	4	1,284E+14	1,414	,255
Error	2,542E+15	28	9,078E+13		
Total	6,514E+17	33			
Corrected Total	3,055E+15	32			

a. R Squared = ,168 (Adjusted R Squared = ,049)

Η μετά-ανάλυση (post hoc analysis) δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της DSP στη σύγκριση μεταξύ των ομάδων μεταξύ τους και ως προς την ομάδα 1- control (βλέπε πίνακα 11). Οι μέσοι όροι, το πλήθος, η σταθερή υπόκλιση και το σταθερό σφάλμα εμφανίζονται στον πίνακα 12.

Πίνακας 11.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: DSP

LSD

(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-5385600,00	6391330,320	,407	-18477646,67	7706446,67
	3	-1680000,00	5636623,524	,768	-13226099,88	9866099,88
	4	-9236571,43	5971759,836	,133	-21469166,93	2996024,07
	5	-10114285,71	5971759,836	,101	-22346881,21	2118309,78
2	1	5385600,00	6391330,320	,407	-7706446,67	18477646,67
	3	3705600,00	5218499,354	,484	-6984011,35	14395211,35
	4	-3850971,43	5578810,473	,496	-15278646,64	7576703,79
	5	-4728685,71	5578810,473	,404	-16156360,93	6698989,50
3	1	1680000,00	5636623,524	,768	-9866099,88	13226099,88
	2	-3705600,00	5218499,354	,484	-14395211,35	6984011,35
	4	-7556571,43	4695268,660	,119	-17174393,28	2061250,43
	5	-8434285,71	4695268,660	,083	-18052107,57	1183536,14
4	1	9236571,43	5971759,836	,133	-2996024,07	21469166,93
	2	3850971,43	5578810,473	,496	-7576703,79	15278646,64
	3	7556571,43	4695268,660	,119	-2061250,43	17174393,28
	5	-877714,29	5092733,900	,864	-11309706,78	9554278,21
5	1	10114285,71	5971759,836	,101	-2118309,78	22346881,21
	2	4728685,71	5578810,473	,404	-6698989,50	16156360,93
	3	8434285,71	4695268,660	,083	-1183536,14	18052107,57
	4	877714,29	5092733,900	,864	-9554278,21	11309706,78

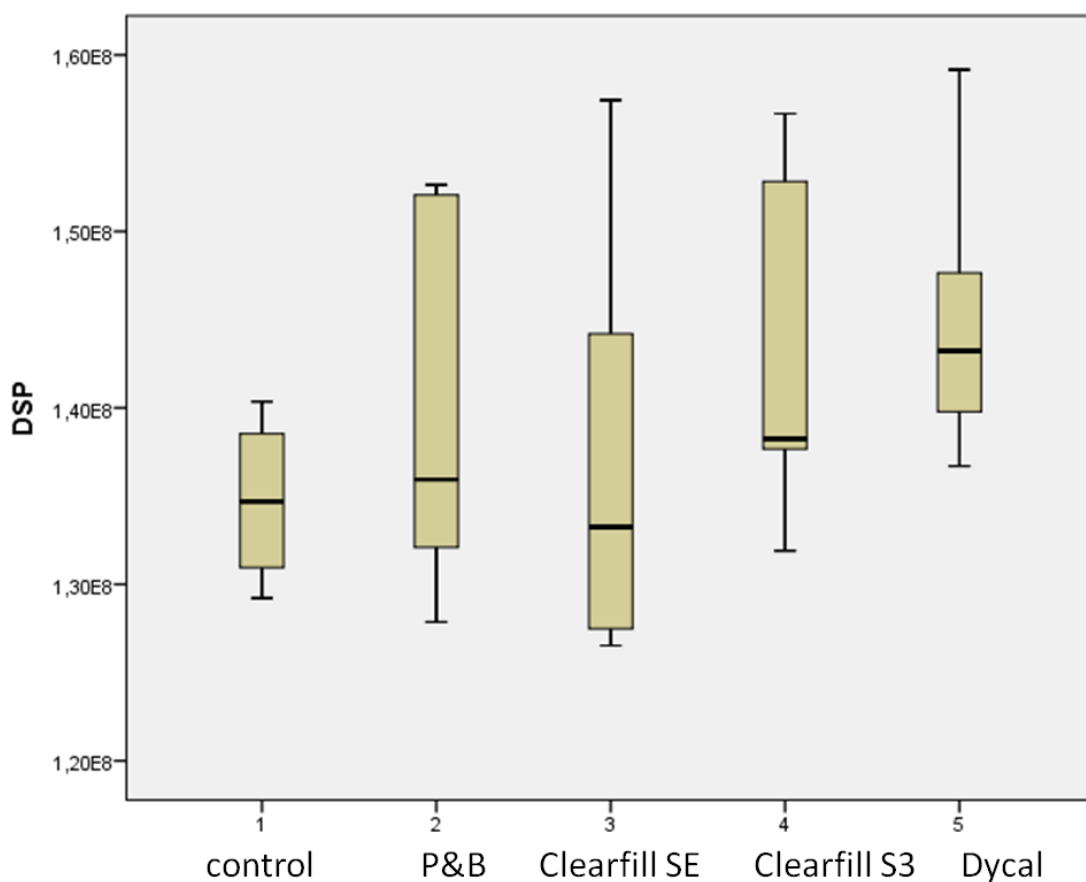
Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 90775785012244,900.

Πίνακας 12.

DSP				
Ομάδες	Mean	N	Std.Deviation	Std. Error of Mean
1	1,35E+08	4	4835390	2417695
2	1,4E+08	5	11525119	5154190
3	1,36E+08	10	10576569	3344605
4	1,44E+08	7	9890907	3738411
5	1,45E+08	7	7599463	2872327

Τα επίπεδα της DSP για όλες τις ομάδες εμφανίζονται στην εικόνα 14.



Εικόνα 14. Θηκόγραμμα(box plot) των συνολικών επίπεδων της DSP στον πολφό. Στον κατακόρυφο άξονα εμφανίζονται οι τιμές της σχετικής πυκνότητας της ανοσοϊστοχημικής χρώσης. Στον οριζόντιο άξονα εμφανίζονται οι ομάδες: 1) control-DPBS, 2) Prime and Bond , 3) Clearfill SE, 4) Clearfill S3, 5) Dycal .Η οριζόντια μαύρη γραμμή εντός του κάθε ορθογώνιου παραλληλόγραμμου αντιστοιχεί στη διάμεσο της κατανομής. Το πάνω όριο της κατακόρυφης γραμμής που διατρέχει το κάθε ορθογώνιο παραλληλόγραμμο αντιστοιχεί στην μέγιστη τιμή της κατανομής και το κάτω όριο στην ελάχιστη.

Για να διερευνηθεί κατά πόσο οι επιπτώσεις που ανιχνεύτηκαν στο σύνολο του πολφού είναι ίδιες με αυτές στην οδοντινοβλαστική στοιβάδα έγινε στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων μόνο για τις περιοχές (a) η περιοχή της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (περιοχή εφαρμογής παραγόντων στις ομάδες

ενδιαφέροντος) και (b) η περιοχή πέριξ της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (όμορα των περιοχών εφαρμογής των παραγόντων).

Και σε αυτήν την περίπτωση όπως φαίνεται στον πίνακα 13, η τοποθέτηση των παραγόντων στον πολφό δεν είχε στατιστικά σημαντική επίπτωση στα επίπεδα της πρωτεΐνης DSP ($p = 0,128$ Πίνακας 13).

Πίνακας 13.

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: DSP					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5,583E+14 ^a	4	1,396E+14	2,064	,128
Intercept	4,145E+17	1	4,145E+17	6128,844	,000
GROUP	5,583E+14	4	1,396E+14	2,064	,128
Error	1,217E+15	18	6,762E+13		
Total	4,405E+17	23			
Corrected Total	1,776E+15	22			

a. R Squared = ,314 (Adjusted R Squared = ,162)

Ωστόσο, η μετά-ανάλυση (Post Hoc Analysis) έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της DSP στη σύγκριση μεταξύ των ομάδων 3 (Clearfill SE) και 4 (Clearfill S3), με την ομάδα 3 να έχει μειωμένα επίπεδα DSP ως προς την ομάδα 4 ($p=0,035$). Η ομάδα 3 φάνηκε να έχει οριακά μειωμένα επίπεδα DSP ως προς την ομάδα 5 (Dycal, $p=0,057$) χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντικά (βλέπε πίνακα 14). Οι μέσοι όροι, το πλήθος, η σταθερή απόκλιση και το σταθερό σφάλμα εμφανίζονται στον πίνακα 15.

Πίνακας 14.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: DSP

LSD

(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-8304000,00	6280741,527	,203	-21499348,30	4891348,30
	3	1248000,00	5814836,747	,832	-10968518,68	13464518,68
	4	-10137600,00	6005537,569	,109	-22754766,24	2479566,24
	5	-8870400,00	6005537,569	,157	-21487566,24	3746766,24
2	1	8304000,00	6280741,527	,203	-4891348,30	21499348,30
	3	9552000,00	5308195,425	,089	-1600104,76	20704104,76
	4	-1833600,00	5516438,503	,743	-13423207,24	9756007,24
	5	-566400,00	5516438,503	,919	-12156007,24	11023207,24
3	1	-1248000,00	5814836,747	,832	-13464518,68	10968518,68
	2	-9552000,00	5308195,425	,089	-20704104,76	1600104,76
	4	-11385600,0*	4979528,695	,035	-21847201,59	-923998,41
	5	-10118400,00	4979528,695	,057	-20580001,59	343201,59
4	1	10137600,00	6005537,569	,109	-2479566,24	22754766,24
	2	1833600,00	5516438,503	,743	-9756007,24	13423207,24
	3	11385600,00*	4979528,695	,035	923998,41	21847201,59
	5	1267200,00	5200948,098	,810	-9659586,49	12193986,49
5	1	8870400,00	6005537,569	,157	-3746766,24	21487566,24
	2	566400,00	5516438,503	,919	-11023207,24	12156007,24
	3	10118400,00	4979528,695	,057	-343201,59	20580001,59
	4	-1267200,00	5200948,098	,810	-12193986,49	9659586,49

Based on observed means.

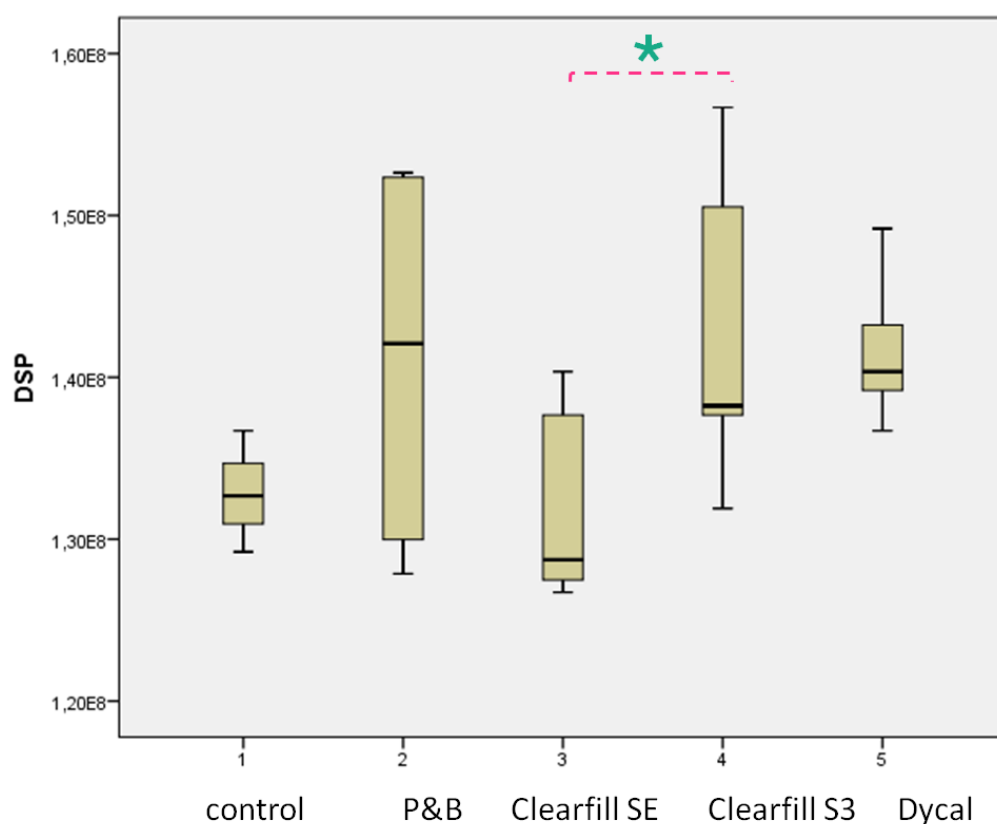
The error term is Mean Square(Error) = 67624652800000,000.

*. The mean difference is significant at the 0,05 level.

Πίνακας 15.

DSP				
Ομάδες	Mean	N	Std.Deviation	Std. Error of Mean
1	1,33E+08	3	3747690	2163730
2	1,41E+08	4	13030917	6515459
3	1,32E+08	6	5839768	2384075
4	1,43E+08	5	10220642	4570810
5	1,42E+08	5	4779605	2137504

Τα επίπεδα της DSP στην οδοντινοβλαστική στοιβάδα (περιοχές a+b) για όλες τις ομάδες εμφανίζονται στην εικόνα 15.



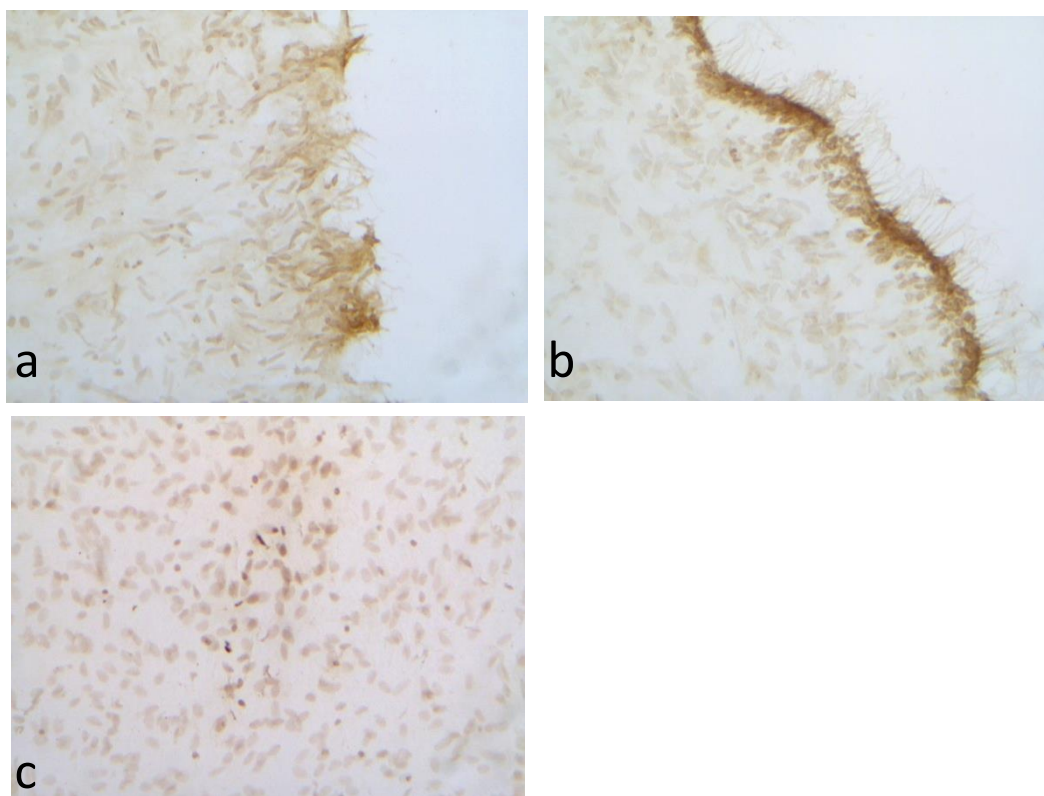
Εικόνα 15. Θηκόγραμμα (box plot) των επιπέδων της DSP στην οδοντινοβλαστική στοιβάδα (περιοχές a+b). Στον κατακόρυφο άξονα εμφανίζονται οι τιμές της σχετικής πυκνότητας της ανοσοϊστοχημικής χρώσης. Στον οριζόντιο άξονα εμφανίζονται οι ομάδες: 1) control-DPBS, 2) Prime and Bond, 3) Clearfill SE, 4) Clearfill S3, 5) Dycal. Η οριζόντια μαύρη γραμμή εντός του κάθε ορθογώνιου παραλληλόγραμμου αντιστοιχεί στη διάμεσο της κατανομής. Το πάνω όριο της κατακόρυφης γραμμής που διατρέχει το κάθε ορθογώνιο παραλληλόγραμμο αντιστοιχεί στην μέγιστη τιμή της κατανομής και το κάτω όριο στην ελάχιστη. Όπου * - στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ δυο ομάδων με $p < 0,05$. Οι διακεκομμένες αγκύλες και ο πράσινος αστερίσκος (*) υποδεικνύουν τη διαφορά μεταξύ δυο πειραματικών ομάδων.

Συμπερασματικά τα επίπεδα της DSP μειώθηκαν μόνο στην οδοντινοβλαστική στοιβάδα της ομάδας 3 (Clearfill SE) και μόνο συγκριτικά με την ομάδα 4 (Clearfill S3).

3.3. ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ DNAJ10 /ERdj5

Οι αλλαγές στα επίπεδα της DNAJ10 /ERdj5 περιγράφονται πρώτα για το σύνολο του πολφού όπως προέκυψε από την ποσοτικοποίηση και την ανάλυση οπτικών πεδίων που περιελάμβαναν χαρακτηριστικές περιοχές του πολφού. Οι περιοχές αυτές ήταν :

- (a) η περιοχή της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (περιοχή εφαρμογής παραγόντων στις ομάδες ενδιαφέροντος)
- (b) η περιοχή πέριξ της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (όμορα των περιοχών εφαρμογής των παραγόντων)
- (c) η κεντρική περιοχή του πολφού.



Εικόνα 16. Ενδεικτικές εικόνες μικροσκοπίου που χρησιμοποιήθηκαν στην ποσοτικοποίηση της ανοσοϊστοχημείας για τα επίπεδα της **DNAJ10 /ERdj5** (a) η περιοχή της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης(περιοχή εφαρμογής παραγόντων στις ομάδες ενδιαφέροντος), (b) η περιοχή πέριξ της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (όμορα των περιοχών εφαρμογής των παραγόντων), (c) η κεντρική περιοχή του πολφού.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 16 (που προέκυψε από την ANOVA στο πρόγραμμα SPSS) η τοποθέτηση των παραγόντων στον πολφό δεν είχε στατιστικά σημαντική επίπτωση στα επίπεδα της πρωτεΐνης DNAJ10 /ERdj5 ($p=0,253$).

Πίνακας 16.

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: ERDJ5					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	9.049E+15 ^a	4	2.262E+15	1.422	.253
Intercept	4.199E+17	1	4.199E+17	263.981	.000
GROUP	9.049E+15	4	2.262E+15	1.422	.253
Error	4.454E+16	28	1.591E+15		
Total	5.509E+17	33			
Corrected Total	5.359E+16	32			

a. R Squared = .169 (Adjusted R Squared = .050)

Η μετά-ανάλυση (post hoc analysis) δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της DNAJ10 /ERdj5 στη σύγκριση μεταξύ των ομάδων μεταξύ τους και ως προς την ομάδα 1- control. Τα επίπεδα στις πειραματικές ομάδες φάνηκε να μειώνονται, ωστόσο μόνο στην ομάδα 4 (Clearfill S3) η μείωση αυτή είναι στατιστικά σημαντική ως προς την ομάδα 1- control ($p=0.033$) (βλέπε πίνακα 17).

Οι μέσοι όροι, το πλήθος, η σταθερή υπόκλιση και το σταθερό σφάλμα εμφανίζονται στον πίνακα 18.

Πίνακας 17.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ERDJ5

LSD

(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	23825142.86	20642480.31	.258	-18459061.23	66109346.94
	3	32136000.00	19942530.61	.118	-8714422.12	72986422.12
	4	46261714.29*	20642480.31	.033	3977510.20	88545918.37
	5	38024000.00	27002314.09	.170	-17287733.03	93335733.03
2	1	-23825142.86	20642480.31	.258	-66109346.94	18459061.23
	3	8310857.14	20642480.31	.690	-33973346.94	50595061.23
	4	22436571.43	21319461.99	.302	-21234366.77	66107509.62
	5	14198857.14	27523307.08	.610	-42180081.64	70577795.92
3	1	-32136000.00	19942530.61	.118	-72986422.12	8714422.12
	2	-8310857.14	20642480.31	.690	-50595061.23	33973346.94
	4	14125714.29	20642480.31	.499	-28158489.80	56409918.37
	5	5888000.00	27002314.09	.829	-49423733.03	61199733.03
4	1	-46261714.3*	20642480.31	.033	-88545918.37	-3977510.20
	2	-22436571.43	21319461.99	.302	-66107509.62	21234366.77
	3	-14125714.29	20642480.31	.499	-56409918.37	28158489.80
	5	-8237714.29	27523307.08	.767	-64616653.07	48141224.50
5	1	-38024000.00	27002314.09	.170	-93335733.03	17287733.03
	2	-14198857.14	27523307.08	.610	-70577795.92	42180081.64
	3	-5888000.00	27002314.09	.829	-61199733.03	49423733.03
	4	8237714.29	27523307.08	.767	-48141224.50	64616653.07

Based on observed means.

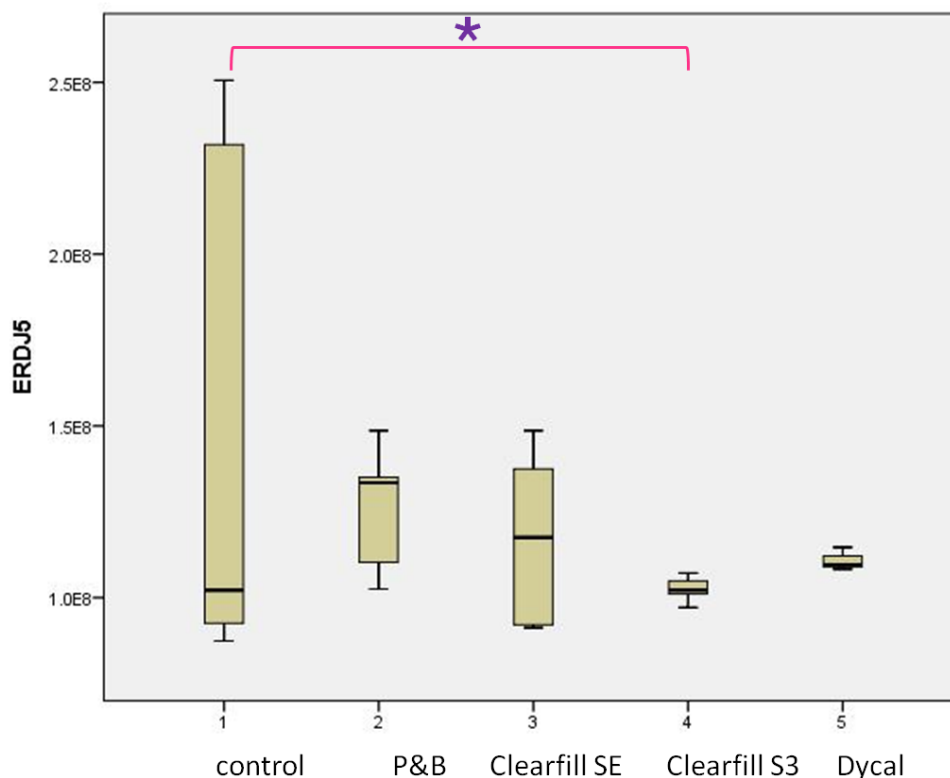
The error term is Mean Square(Error) = 1590818108081632.800.

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Πίνακας 18.

ERDJ5				
Ομάδες	Mean	N	Std.Deviation	Std. Error of Mean
1	148872000	8	74271421	26258913
2	125046857,1	7	17296957	6537635
3	116736000	8	24011956	8489508
4	102610285,7	7	3553915	1343253
5	110848000	3	3338445	1927452

Τα επίπεδα της DNAJ10 / ERdj5 για όλες τις ομάδες εμφανίζονται στην εικόνα 17.



Εικόνα 17. Θηκόγραμμα (box plot) των συνολικών επιπέδων της DNAJ10 /ERdj5 στον πολφό. Στον κατακόρυφο άξονα εμφανίζονται οι τιμές της σχετικής πυκνότητας της ανοσοϊστοχημικής χρώσης. Στον οριζόντιο άξονα εμφανίζονται οι ομάδες: 1) control-DPBS , 2) Prime and Bond , 3) Clearfill SE, 4) Clearfill S3, 5) Dycal .Η οριζόντια μαύρη γραμμή εντός του κάθε ορθογώνιου παραλληλόγραμμου αντιστοιχεί στη διάμεσο της κατανομής. Το πάνω όριο της κατακόρυφης γραμμής που διατρέχει το κάθε ορθογώνιο παραλληλόγραμμο αντιστοιχεί στην μέγιστη τιμή της κατανομής και το κάτω όριο στην ελάχιστη. Όπου * - στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ δυο ομάδων με $p < 0,05$. Οι συνεχείς αγκύλες και ο μοβ αστερίσκος (*) υποδεικνύουν τη διαφορά ανάμεσα στις πειραματικές ομάδες και την ομάδα 1-control.

Συμπερασματικά τα επίπεδα της DNAJ10 /ERdj5 μειώθηκαν στον πολφό της πειραματικής ομάδας 4 (Clearfill S3) σε σχέση με την ομάδα 1-control.

Για να διερευνηθεί κατά πόσο οι επιπτώσεις που ανιχνεύτηκαν στο σύνολο του πολφού είναι ίδιες με αυτές στην οδοντινοβλαστική στοιβάδα έγινε στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων μόνο για τις περιοχές (a) η περιοχή της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (περιοχή εφαρμογής παραγόντων στις ομάδες ενδιαφέ-

ροντος) και **(b)** η περιοχή πέριξ της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (όμορα των περιοχών εφαρμογής των παραγόντων).

Σε αυτήν την περίπτωση, όπως φαίνεται στον πίνακα 19, η τοποθέτηση των παραγόντων στον πολφό δεν είχε στατιστικά σημαντική επίπτωση στα επίπεδα της πρωτεΐνης DNAJ10 /ERdj5 ($p = 0,536$ Πίνακας 19).

Πίνακας 19.

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: ERDJ5					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5,299E+15 ^a	4	1,325E+15	,809	,536
Intercept	2,767E+17	1	2,767E+17	168,993	,000
GROUP	5,299E+15	4	1,325E+15	,809	,536
Error	2,784E+16	17	1,638E+15		
Total	3,657E+17	22			
Corrected Total	3,314E+16	21			

a. R Squared = ,160 (Adjusted R Squared = -,038)

Συνακόλουθα, η μετά-ανάλυση (Post Hoc Analysis) επίσης δεν έδειξε αλλαγές των επιπέδων της DNAJ10 /ERdj5 στη σύγκριση μεταξύ των ομάδων μεταξύ τους και ως προς την ομάδα 1- control (βλέπε πίνακα 20). Οι μέσοι όροι, το πλήθος, η σταθερή απόκλιση και το σταθερό σφάλμα εμφανίζονται στον πίνακα 21.

Πίνακας 20.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ERDJ5

LSD

(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	19353600,00	25593253,61	,460	-34643445,14	73350645,14
	3	30617600,00	24503674,78	,228	-21080634,76	82315834,76
	4	44265600,00	27145744,77	,121	-13006915,18	101538115,2
	5	38265600,00	33856692,14	,274	-33165776,49	109696976,5
2	1	-19353600,00	25593253,61	,460	-73350645,14	34643445,14
	3	11264000,00	24503674,78	,652	-40434234,76	62962234,76
	4	24912000,00	27145744,77	,372	-32360515,18	82184515,18
	5	18912000,00	33856692,14	,584	-52519376,49	90343376,49
3	1	-30617600,00	24503674,78	,228	-82315834,76	21080634,76
	2	-11264000,00	24503674,78	,652	-62962234,76	40434234,76
	4	13648000,00	26121005,08	,608	-41462503,42	68758503,42
	5	7648000,00	33040748,33	,820	-62061885,53	77357885,53
4	1	-44265600,00	27145744,77	,121	-101538115,2	13006915,18
	2	-24912000,00	27145744,77	,372	-82184515,18	32360515,18
	3	-13648000,00	26121005,08	,608	-68758503,42	41462503,42
	5	-6000000,00	35045005,80	,866	-79938499,16	67938499,16
5	1	-38265600,00	33856692,14	,274	-109696976,5	33165776,49
	2	-18912000,00	33856692,14	,584	-90343376,49	52519376,49
	3	-7648000,00	33040748,33	,820	-77357885,53	62061885,53
	4	6000000,00	35045005,80	,866	-67938499,16	79938499,16

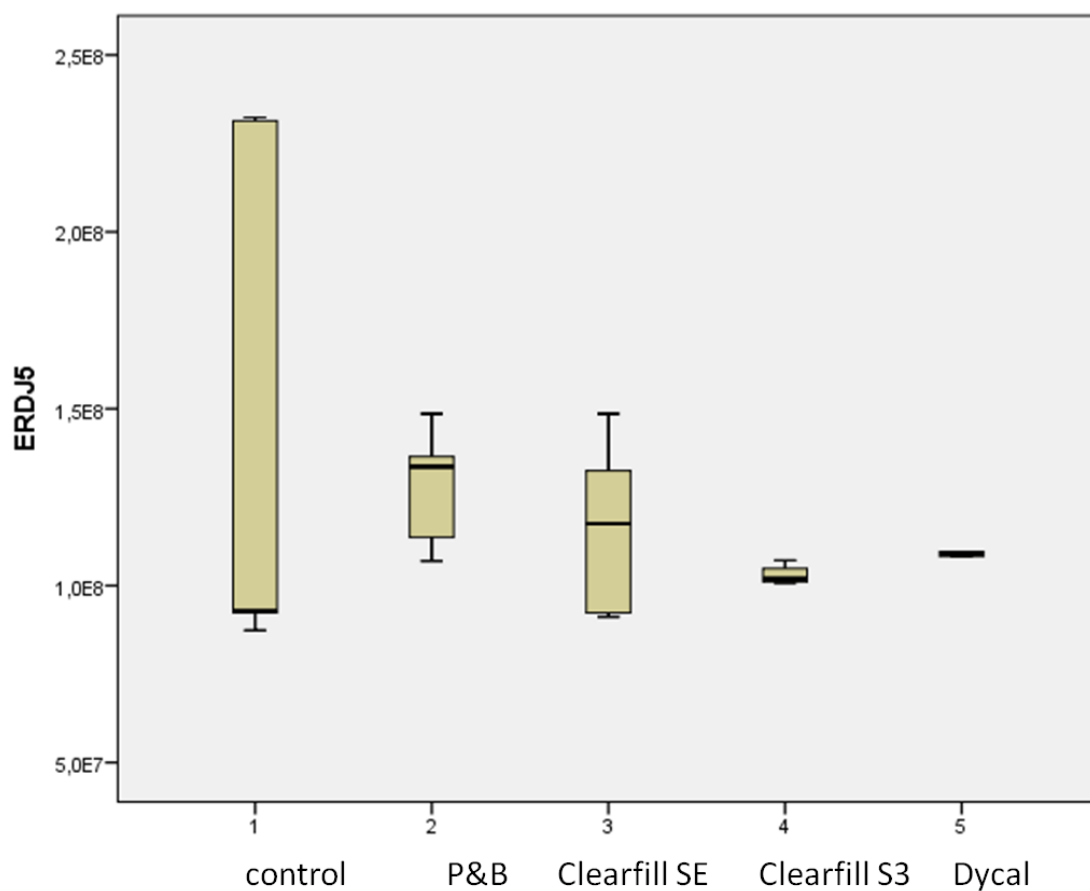
Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1637536575247058,800.

Πίνακας 21.

ERDJ5				
Ομάδες	Mean	N	Std.Deviation	Std. Error of Mean
1	1,47E+08	5	77271878	34557035
2	1,28E+08	5	17158506	7673517
3	1,17E+08	6	23456292	9575991
4	1,03E+08	4	2875196	1437598
5	1,09E+08	2	950351,5	672000

Τα επίπεδα της DNAJ10 /ERdj5 στην οδοντινοβλαστική στοιβάδα (περιοχές a+b) για όλες τις ομάδες εμφανίζονται στην εικόνα 18.

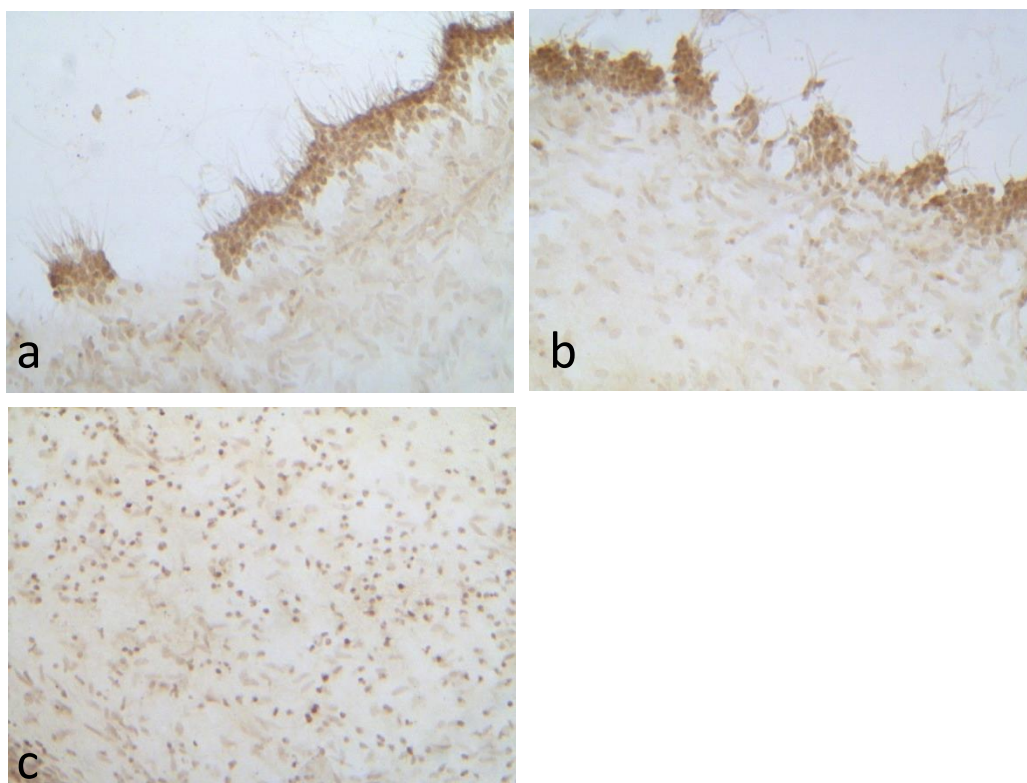


Εικόνα 18. Θηκόγραμμα (box plot) των επιπέδων της DNAJ10 /ERdj5 στην οδοντινοβλαστική στοιβάδα (περιοχές a+b). Στον κατακόρυφο άξονα εμφανίζονται οι τιμές της σχετικής πυκνότητας της ανοσοϊστοχημικής χρώσης. Στον οριζόντιο άξονα εμφανίζονται οι ομάδες: 1) control-DPBS, 2) Prime and Bond, 3) Clearfill SE, 4) Clearfill S3, 5) Dycal. Η οριζόντια μαύρη γραμμή εντός του κάθε ορθογώνιου παραλληλόγραμμου αντιστοιχεί στη διάμεσο της κατανομής. Το πάνω όριο της κατακόρυφης γραμμής που διατρέχει το κάθε ορθογώνιο παραλληλόγραμμο αντιστοιχεί στην μέγιστη τιμή της κατανομής και το κάτω όριο στην ελάχιστη.

3.4. ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ TRXR1

Οι αλλαγές στα επίπεδα της TRXR1 περιγράφονται πρώτα για το σύνολο του πολφού όπως προέκυψε από την ποσοτικοποίηση και την ανάλυση οπτικών πεδίων που περιελάμβαναν χαρακτηριστικές περιοχές του πολφού. Οι περιοχές αυτές ήταν :

- (a) η περιοχή της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (περιοχή εφαρμογής παραγόντων στις ομάδες ενδιαφέροντος)
- (b) η περιοχή πέριξ της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (όμορα των περιοχών εφαρμογής των παραγόντων)
- (c) η κεντρική περιοχή του πολφού.



Εικόνα 19. Ενδεικτικές εικόνες μικροσκοπίου που χρησιμοποιήθηκαν στην ποσοτικοποίηση της ανοσοϊστοχημείας για τα επίπεδα της **TRXR1** (**a**) η περιοχή της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (περιοχή εφαρμογής παραγόντων στις ομάδες ενδιαφέροντος), (**b**) η περιοχή πέριξ της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (όμορα των περιοχών εφαρμογής των παραγόντων), (**c**) η κεντρική περιοχή του πολφού.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 22 (που προέκυψε από την ANOVA στο πρόγραμμα SPSS) η τοποθέτηση των παραγόντων στον πολφό είχε στατιστικά σημαντική επίπτωση στα επίπεδα της πρωτεΐνης TRXR1 ($p=0,007$).

Πίνακας 22.

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: TRXR1					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3.325E+15 ^a	4	8.313E+14	4.322	.007
Intercept	7.502E+17	1	7.502E+17	3900.394	.000
GROUP	3.325E+15	4	8.313E+14	4.322	.007
Error	6.155E+15	32	1.923E+14		
Total	8.495E+17	37			
Corrected Total	9.480E+15	36			

a. R Squared = .351 (Adjusted R Squared = .270)

Η μετά-ανάλυση (post hoc analysis) έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της TRXR1 στη σύγκριση της ομάδας 2 (Prime and Bond) ως προς την ομάδα 1- control, αλλά και στη σύγκριση μεταξύ ορισμένων από τις πειραματικές ομάδες. Συγκεκριμένα η πειραματική ομάδα 2 παρουσίασε αυξημένα επίπεδα συγκριτικά με την ομάδα 1- control ($p=0,034$), αλλά και σε σύγκριση με τις ομάδες 3 (Clearfill SE, $p=0,002$) και 5 (Dycal, $p=0,010$). Επιπλέον στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της TRXR1 ανέδειξε η σύγκριση της ομάδας 4 (Clearfill S3) με τις ομάδες 3 ($p=0,008$) και 5 ($p=0,025$), και οριακά με την ομάδα 1- control ($p=0,073$). (βλέπε πίνακα 23).

Οι μέσοι όροι, το πλήθος, η σταθερή υπόκλιση και το σταθερό σφάλμα εμφανίζονται στον πίνακα 24.

Πίνακας 23.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TRXR1

LSD

(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-18009600.0*	8120637.559	.034	-34550797.42	-1468402.58
	3	3346707.69	7298155.304	.650	-11519148.19	18212563.58
	4	-15047314.29	8120637.559	.073	-31588511.70	1493883.13
	5	4070400.00	8771291.055	.646	-13796135.21	21936935.21
2	1	18009600.00*	8120637.559	.034	1468402.58	34550797.42
	3	21356307.69*	6501713.501	.002	8112750.67	34599864.71
	4	2962285.71	7413093.954	.692	-12137692.54	18062263.97
	5	22080000.00*	8120637.559	.010	5538802.58	38621197.42
3	1	-3346707.69	7298155.304	.650	-18212563.58	11519148.19
	2	-21356307.7*	6501713.501	.002	-34599864.71	-8112750.67
	4	-18394022.0*	6501713.501	.008	-31637579.00	-5150464.96
	5	723692.31	7298155.304	.922	-14142163.58	15589548.19
4	1	15047314.29	8120637.559	.073	-1493883.13	31588511.70
	2	-2962285.71	7413093.954	.692	-18062263.97	12137692.54
	3	18394021.98*	6501713.501	.008	5150464.96	31637579.00
	5	19117714.29*	8120637.559	.025	2576516.87	35658911.70
5	1	-4070400.00	8771291.055	.646	-21936935.21	13796135.21
	2	-22080000.0*	8120637.559	.010	-38621197.42	-5538802.58
	3	-723692.31	7298155.304	.922	-15589548.19	14142163.58
	4	-19117714.3*	8120637.559	.025	-35658911.70	-2576516.87

Based on observed means.

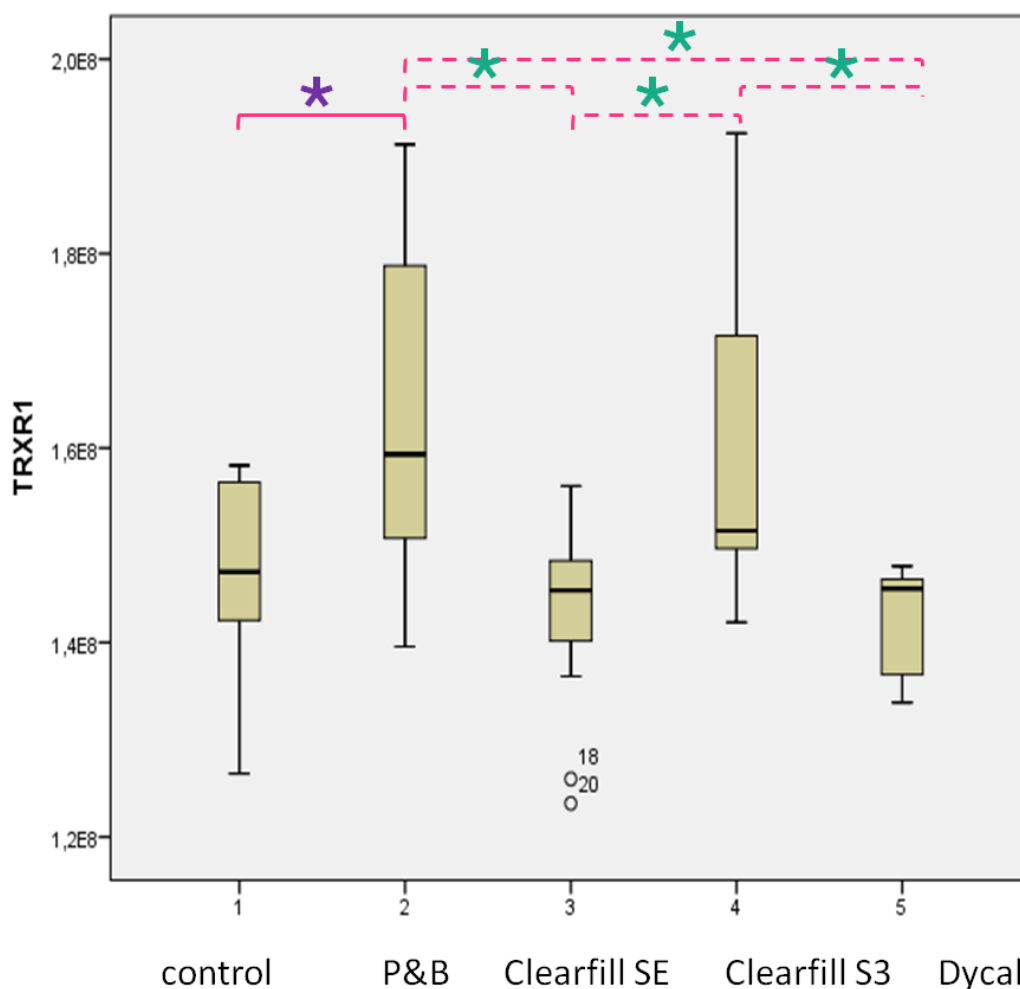
The error term is Mean Square(Error) = 192338866918681.340.

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Πίνακας 24.

TRXR1				
Ομάδες	Mean	N	Std.Deviation	Std. Error of Mean
1	146150400	5	12780914	5715798
2	164160000	7	19543173	7386625
3	142803692,3	13	9407397	2609143
4	161197714,3	7	18194084	6876717
5	142080000	5	6357781	2843286

Τα επίπεδα της TRXR1 για όλες τις ομάδες εμφανίζονται στην εικόνα 20.



Εικόνα 20. Θηκόγραμμα (box plot) των συνολικών επιπέδων της TRXR1 στον πολφό. Στον κατακόρυφο άξονα εμφανίζονται οι τιμές της σχετικής πυκνότητας της ανοσοϊστοχημικής χρώσης. Στον οριζόντιο άξονα εμφανίζονται οι ομάδες: 1) control-DPBS, 2) Prime and Bond, 3) Clearfill SE, 4) Clearfill S3, 5) Dycal. Η οριζόντια μαύρη γραμμή εντός του κάθε ορθογώνιου παραλληλόγραμμου αντιστοιχεί στη διάμεσο της κατανομής. Το πάνω όριο της κατακόρυφης γραμμής που διατρέχει το κάθε ορθογώνιο παραλληλόγραμμο αντιστοιχεί στην μέγιστη τιμή της κατανομής και το κάτω όριο στην ελάχιστη. Οι ανοιχτοί κύκλοι υποδεικνύουν δυο δυνητικά παρεκκλίνουσες τιμές (outliers). Όπου *, * - στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ δυο ομάδων με $p < 0,05$. Οι συνεχείς αγκύλες και ο μοβ αστερίσκος (*) υποδεικνύουν τη διαφορά ανάμεσα στις πειραματικές ομάδες και την ομάδα 1-control. Οι διακεκομμένες αγκύλες και ο πράσινος αστερίσκος (*) υποδεικνύουν τη διαφορά μεταξύ δυο πειραματικών ομάδων.

Συμπερασματικά τα επίπεδα της TRXR1 αυξάνονταν για την πειραματική ομάδα 2 (Prime and Bond) ως προς τις ομάδες 1-control (DPBS), 3 (Clearfill SE) και 5 (Dycal). Αύξηση παρατηρήθηκε και στα επίπεδα TRXR1 της πειραματικής ομάδας 4 ως προς τις ομάδες 3 και 5.

Για να διερευνηθεί κατά πόσο οι επιπτώσεις που ανιχνεύτηκαν στο σύνολο του πολφού είναι ίδιες με αυτές στην οδοντινοβλαστική στοιβάδα έγινε στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων μόνο για τις περιοχές (a) η περιοχή της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (περιοχή εφαρμογής παραγόντων στις ομάδες ενδιαφέροντος) και (b) η περιοχή πέριξ της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας μύλης (όμορα των περιοχών εφαρμογής των παραγόντων).

Σε αυτήν την περίπτωση όπως φαίνεται στον πίνακα 25, η τοποθέτηση των παραγόντων στον πολφό δεν είχε στατιστικά σημαντική επίπτωση στα επίπεδα της πρωτεΐνης TRXR1 ($p = 0,189$, Πίνακας 25).

Πίνακας 25.

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: TRXR1					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2,691E+15 ^a	4	6,729E+14	1,696	,189
Intercept	5,200E+17	1	5,200E+17	1310,741	,000
GROUP	2,691E+15	4	6,729E+14	1,696	,189
Error	8,331E+15	21	3,967E+14		
Total	6,054E+17	26			
Corrected Total	1,102E+16	25			

a. R Squared = ,244 (Adjusted R Squared = ,100)

Η μετά-ανάλυση (post hoc analysis) δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της TRXR1 στη σύγκριση μεταξύ των ομάδων μεταξύ τους και ως προς την ομάδα 1- control (βλέπε πίνακα 26). Ωστόσο, τα επίπεδα της ομάδας 3 (Clearfill SE) στην οδοντινοβλαστική στοιβάδα εμφανιστήκαν οριακά μειωμένα ως προς την ομάδα 1- control ($p = 0,061$). Οι μέσοι όροι, το πλήθος, η σταθερή υπόκλιση και το σταθερό σφάλμα εμφανίζονται στον πίνακα 27.

Πίνακας 26.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TRXR1

LSD

(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	4166400,00	13361316,12	,758	-23619977,99	31952777,99
	3	23289600,00	11783573,22	,061	-1215682,00	47794882,00
	4	3264000,00	14084063,83	,819	-26025414,13	32553414,13
	5	20960000,00	15212527,61	,183	-10676183,03	52596183,03
2	1	-4166400,00	13361316,12	,758	-31952777,99	23619977,99
	3	19123200,00	10909468,93	,094	-3564282,63	41810682,63
	4	-902400,00	13361316,12	,947	-28688777,99	26883977,99
	5	16793600,00	14545958,58	,261	-13456376,84	47043576,84
3	1	-23289600,00	11783573,22	,061	-47794882,00	1215682,00
	2	-19123200,00	10909468,93	,094	-41810682,63	3564282,63
	4	-20025600,00	11783573,22	,104	-44530882,00	4479682,00
	5	-2329600,00	13111549,87	,861	-29596560,64	24937360,64
4	1	-3264000,00	14084063,83	,819	-32553414,13	26025414,13
	2	902400,00	13361316,12	,947	-26883977,99	28688777,99
	3	20025600,00	11783573,22	,104	-4479682,00	44530882,00
	5	17696000,00	15212527,61	,258	-13940183,03	49332183,03
5	1	-20960000,00	15212527,61	,183	-52596183,03	10676183,03
	2	-16793600,00	14545958,58	,261	-47043576,84	13456376,84
	3	2329600,00	13111549,87	,861	-24937360,64	29596560,64
	4	-17696000,00	15212527,61	,258	-49332183,03	13940183,03

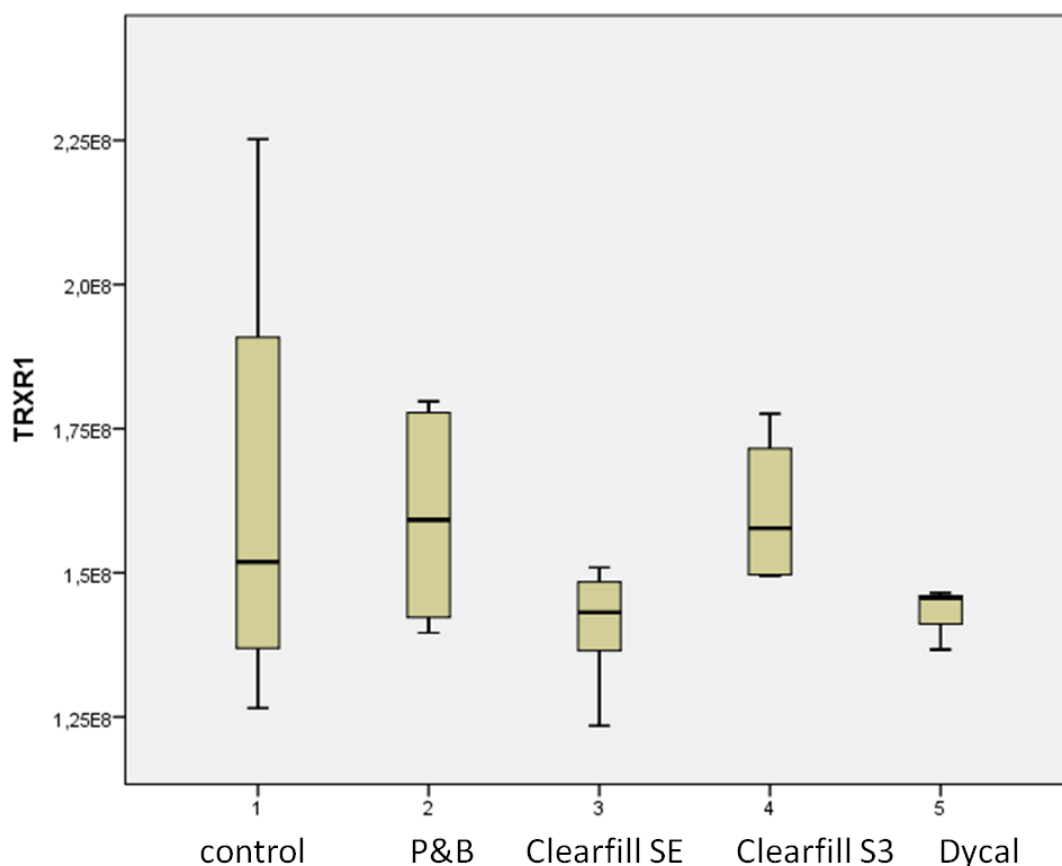
Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 396721707885714,300.

Πίνακας 27.

TRXR1				
Ομάδες	Mean	N	Std.Deviation	Std. Error of Mean
1	1,64E+08	4	42771205	21385603
2	1,6E+08	5	18950410	8474881
3	1,41E+08	10	9403776	2973735
4	1,61E+08	4	13569660	6784830
5	1,43E+08	3	5397671	3116347

Τα επίπεδα της TRXR1 στην οδοντινοβλαστική στοιβάδα (περιοχές a+b) για όλες τις ομάδες εμφανίζονται στην εικόνα 21.



Εικόνα 21. Θηκόγραμμα (box plot) των συνολικών επιπέδων της TRXR1 στην οδοντινοβλαστική στοιβάδα (περιοχές a+b). Στον κατακόρυφο άξονα εμφανίζονται οι τιμές της σχετικής πυκνότητας της ανοσοϊστοχημικής χρώσης. Στον οριζόντιο άξονα εμφανίζονται οι ομάδες: 1) control-DPBS, 2) Prime and Bond, 3) Clearfill SE, 4) Clearfill S3, 5) Dycal. Η οριζόντια μαύρη γραμμή εντός του κάθε ορθογώνιου παραλληλόγραμμου αντιστοιχεί στη διάμεσο της κατανομής. Το πάνω όριο της κατακόρυφης γραμμής που διατρέχει το κάθε ορθογώνιο παραλληλόγραμμο αντιστοιχεί στην μέγιστη τιμή της κατανομής και το κάτω όριο στην ελάχιστη.

4. Συζήτηση

Η διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας του συστήματος πλφού – οδοντίνης μέσω της επίδρασης κάποιου ερεθίσματος έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη φλεγμονής στον πλφό. Ακολουθεί η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος του πλφού, η οποία έχει ως στόχο την ελαχιστοποίηση των ιστικών βλαβών που έχουν προκληθεί εξαιτίας της βλαπτικής επίδρασης. Στην περίπτωση όπου η ένταση του ερεθίσματος είναι μεγάλη, σε συνδυασμό με την μείωση της αιματικής ροής του πλφού, το αποτέλεσμα μπορεί να είναι η νέκρωση του πλφού (Heyerass et al 2001, Ingle et al 2002, Mjor et al 2001, Smith 2002).

Στις περιπτώσεις όπου το βλαπτικό ερέθισμα δε θα οδηγήσει σε νέκρωση του πλφού, πραγματοποιείται μία επανορθωτική διαδικασία. Αρχικά λαμβάνει χώρα η αντιμετώπιση της φλεγμονής στον πλφό, μέσω του τυπικού μηχανισμού για την πρώτη φάση επιδιόρθωσης των συνδετικών ιστών. Έπειτα ακολουθούν οι εξειδικευμένες επανορθωτικές διαδικασίες του συστήματος οδοντίνης πλφού, με διαφοροποίηση νέων οδοντινοβλαστών, εναπόθεση της προοδοντίνης στην περίπλφικη οδοντίνη και ενασβέστωση του εσωτερικού των οδοντινοσωληναρίων στην οδοντίνη, με απώτερο σκοπό την μείωση της διαπερατότητας και της ευαισθησίας της (Heyerass et al 2001, Ingle et al 2002, Mjor et al 2001, Τζιαφάς 1999, Mjor and Ferrari 2002).

Σε οποιαδήποτε θεραπευτική παρέμβαση, κύριο στόχο αποτελεί η πρόληψη και αποφυγή της μόλυνσης του πλφού καθώς και η διατήρηση της ζωτικότητας και λειτουργίας του. Απαραίτητη προϋπόθεση λοιπόν, αποτελεί η επαγωγή της επανορθωτικής οδοντινογένεσης.

Η εισαγωγή νεότερων μεθόδων (π.χ. βιομιμητική, *in vivo* μηχανική των ιστών) αποσκοπεί στην διατήρηση της ζωτικότητας του συνόλου του οδοντικού πλφού. Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος, με σκοπό την επανορθωτική οδοντινογένεση, είναι η άμεση κάλυψη του πλφού με επανορθωτικά υλικά . Ως πιθανά υλικά στην κλινική πράξη για την άμεση κάλυψη του πλφού έχουν προταθεί τα συγκολλητικά συστήματα, λόγω του ότι η συγκολλητική ικανότητά τους εμποδίζει την βακτηριακή μικροδιείσδυση. Ωστόσο, αμφισβητείται η επανορθωτική δράση τους στην θεραπεία του ζωντανού πλφού. Αντιθέτως, γνωστό για τα πλεονεκτήματα

του και καθιερωμένο στην κλινική πράξη παραμένει το υδροξείδιο του ασβεστίου (αντιφλεγμονώδης δράση, χαμηλή κυτταροτοξικότητα κ.α) (Kitasako et al 2000, Schuurs et al 2000, Nowicka et al 2016, Silva et al 2013).

Τα συγκολλητικά συστήματα των σύνθετων ρητινών, επιδρούν στο οδοντινο - πολφικό σύμπλεγμα, προκαλώντας ποικίλες μοριακές αλληλεπιδράσεις. Είναι αποδεδειγμένο ότι τα συστατικά των συγκολλητικών συστημάτων μπορούν να προκαλέσουν διαταραχή στην κυτταρική οξειδοαναγωγική ισορροπία. Αυτό μπορεί να προκαλέσει ακολούθως αύξηση των επιπέδων των ελεύθερων ριζών, οδηγώντας σε βλάβη του κυττάρου, ακόμα και απόπτωση ή νέκρωση (Demirci et al 2008, Gallorini et al 2014). Πιο συγκεκριμένα, τα βασικά μονομερή, τα συν – μονομερή και το φωσφορικό οξύ δύνανται να είναι τοξικά για τα πολφικά κύτταρα (Kim et al, 2015, Chang et al 2010, Li et al 2012, Pameijer & Stanley 1998). Παρόλο που οι αρχικές κλινικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, έδειξαν καλή ανοχή του πολφού στα ρητινώδη συστήματα, σε περιπτώσεις που δεν υπήρχε επαφή με τον πολφικό ιστό, οι *in vitro* μελέτες που ακολούθησαν, προβλημάτισαν έντονα για την ασφάλεια των συστημάτων σε ζωντανό πολφό, λόγω της απελευθέρωσης των μονομερών τους μέσω της οδοντίνης στον πολφό (Ferracane and Condon 1990, Van Landuyt et al 2011). Για παράδειγμα, οι τιμές του ED50 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). Αδιαμφισβήτητη κρίνεται λοιπόν, η ανάγκη κατάλληλων μοντέλων μελέτης μοριακών αλλαγών, που να συνδέονται με την τοξικότητα των υλικών αυτών. Ακόμη, ανοιχτά παραμένουν τα ερωτήματα που αφορούν τους μοριακούς επουλωτικούς μηχανισμούς που ενεργοποιούνται στον ανθρώπινο πολφό, μετά την εφαρμογή των συγκολλητικών παραγόντων. Στις ερευνητικές διαδικασίες αυτές, πολλά υποσχόμενα, παρουσιάζονται τα *ex vivo* μοντέλα μελέτης της δράσης των παραπάνω παραγόντων σε ανθρώπινο πολφό. Ωστόσο, η βιβλιογραφία παραμένει περιορισμένη και απαιτούνται νέες μελέτες, με σκοπό να απαντηθούν τα ερωτήματα για το αν η χρήση των συγκολλητικών παραγόντων στη θεραπεία του ζωντανού πολφού, μπορεί να θεωρηθεί ασφαλής και προβλέψιμη.

Στο πλαίσιο αυτό, η πρόσφατη διδακτορική διατριβή της Δρ. Άννας Ποιμένοβα (Αθήνα 2018) μελέτησε τις πρώιμες αποκρίσεις του ανθρώπινου οδοντικού πολφού, μετά από εφαρμογή τριών διαφορετικών συγκολλητικών συστημάτων και πάστας υδροξειδίου του ασβεστίου, σε ένα *ex vivo* μοντέλο τομών ανθρώπινου οδοντικού πολφού. Σε αυτό το μοντέλο, οι πρώιμες αποκρίσεις του πολφού μελετήθηκαν μέσω διαφορετικών πρωτεϊνών –δεικτών κυτταρικής βλάβης και επιδιόρθωσης. Τα σχετικά ευρήματα έδειξαν ότι οι πρώιμες αποκρίσεις του οδοντικού πολφού στους συγκολλητικούς παράγοντες Prime&Bond, Clearfil SE και Clearfil S3, περιλαμβάνουν τοπική νέκρωση του ιστού, αύξηση της απόπτωσης και του κυτταρικού στρες και - πρόσκαιρα - μειωμένη ικανότητα ιστικής επιδιόρθωσης (Poimenova et al 2018).

Η παρούσα εργασία, επιχείρησε να επεκτείνει τα αποτελέσματα της προαναφερθείσας διδακτορικής διατριβής, ελέγχοντας με ανοσοϊστοχημεία και άλλους πρωτεϊνικούς δείκτες στο ίδιο πειραματικό υλικό. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα επίπεδα δύο βασικών ενδοκυτταρικών, μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών (OPN και DSP), που εμφανίζονται στην οδοντίνη και παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην μεταλλικοποίηση του οργανικού υποστρώματος της οδοντίνης, ρυθμίζοντας το σχηματισμό των κρυστάλλων υδροξυαπατίτη (Min et al 2008). Επίσης, μελετήθηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης- δείκτη του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου ERdj5, καθώς και της πρωτεΐνης – δείκτη του αντιοξειδωτικού συστήματος των θειορεδοξινών TRXR1 στα πολφικά κύτταρα. Η επιλογή της ανοσοϊστοχημείας επέτρεψε τον χωροταξικό εντοπισμό των προαναφερθέντων τεσσάρων πρωτεϊνών, στις διαφορετικές περιοχές του πολφού (εγγύς ή σε απόσταση από το σημείο εφαρμογής των διαφορετικών παραγόντων κάλυψης που εφαρμόστηκαν), ενώ η συνακόλουθη μορφομετρία, την ημιποσοτική εκτίμηση του αποτελέσματος.

Τα αποτελέσματά μας, έδειξαν ότι κάθε εξεταζόμενος παράγοντας, επέδρασε διαφορετικά στα κύτταρα, καθώς, οι κυτταρικές αποκρίσεις στους παράγοντες διέφεραν ως προς αυτές της ομάδας ελέγχου, αλλά και μεταξύ τους.

Η τοποθέτηση των παραγόντων στον πολφό είχε στατιστικά σημαντική επίπτωση στα επίπεδα της πρωτεΐνης OPN για το σύνολο του πολφού, με αύξηση των επιπέδων όλων των πειραματικών ομάδων, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Την μεγαλύτερη αύξηση μεταξύ των πειραματικών ομάδων στα επίπεδα της OPN, παρουσίασε η ομάδα υπό την επίδραση του παράγοντα Clearfil S3, ακολουθούμενη από τις ομάδες

Prime and Bond, Clearfil SE και Dycal. Στις περιοχές της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας της μύλης και πέριξ αυτής, η μετά-ανάλυση έδειξε πάλι στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της OPN στις ομάδες Prime and Bond, Clearfil SE και Dycal, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Η σημαντική αύξηση των επιπέδων της OPN, τόσο στο σύνολο του πολφού αλλά και στις επιμέρους περιοχές (εφαρμογής των παραγόντων και πέριξ αυτών), υποδεικνύει πιθανή επούλωση και έναρξη της επανορθωτικής διαδικασίας. Η αυξημένη παρουσία της βασικής αυτής ενδοκυτταρικής πρωτεΐνης πιθανά υποδηλώνει την έναρξη της μεταλλικοποίησης του οργανικού υποστρώματος της οδοντίνης (Min et al 2008).

Αντιθέτως, η τοποθέτηση των παραγόντων στον πολφό δεν είχε στατιστικά σημαντική επίπτωση στα επίπεδα της DSP στην σύγκριση των ομάδων μεταξύ τους και ως προς την ομάδα ελέγχου, για το σύνολο του πολφού. Μείωση των επιπέδων της DSP παρατηρήθηκε μόνο στην οδοντινοβλαστική στοιβάδα (περιοχή εφαρμογής τους) και μόνο μεταξύ πειραματικών ομάδων (της ομάδας Clearfil SE συγκριτικά με την ομάδα Clearfil S3). Τα ευρήματά μας επιβεβαιώνουν έτσι τα αποτελέσματα της Diamanti et al (2013), όπου η έκφραση της DSP φαίνεται να παραμένει ανεπηρέαστη σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες.

Είναι αποδεδειγμένο το γεγονός ότι μεμονωμένα συστατικά των συγκολλητικών παραγόντων όπως HEMA, TEGDMA, Bis-GMA, καμφοροκινόνη και MDP, προκαλούν μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων της γλουταθειόνης και αύξηση των επιπέδων των ελεύθερων ριζών, οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες, συμβάλλοντας έτσι στην διαδικασία της απόπτωσης (Gallorini et al 2014, Chang et al, 2010, Cann & Hicks, 2007). Οι αλλαγές της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας στα κύτταρα (οξειδωτικό στρες) μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση του στρες του ΕΔ. Αυτό μπορεί να προκληθεί στις περιπτώσεις βλάβης του πολφού, λόγω της αυξημένης πίεσης που ασκείται στο μηχανισμό ποιοτικού ελέγχου του ΕΔ, για την ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Επίσης οι Thomas & Spyrou (2009), έδειξαν ότι η αυξημένη έκφραση της ERdj5 σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και ενεργοποίησης του μηχανισμού απάντησης του ενδοπλασματικού δικτύου στην λανθασμένη αναδίπλωση πρωτεϊνών, μπορεί να πυροδοτήσει το μηχανισμό απόπτωσης του κυττάρου.

Με βάση τα παραπάνω, μελετήσαμε τα επίπεδα της πρωτεΐνης δείκτη του στρες του ERdj5. Αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης η ERdj5 παρατηρούνται σε καταστάσεις αυξημένου κυτταρικού στρες, γεγονός που υποδεικνύει τον καθοριστικό ρόλο της στην αποδόμηση των μη-αναδιπλούμενων ή λανθασμένα αναδιπλούμενων πρωτεϊνών στις περιπτώσεις στρες του ενδοπλασματικού δικτύου. Στα αποτελέσματά μας, για το σύνολο του πολφού, έδειξαν σχετικά μειωμένα επίπεδα της πρωτεΐνης ERdj5 στις πειραματικές ομάδες, ωστόσο μόνο για την ομάδα Clearfil S3 η μείωση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ως προς την ομάδα ελέγχου. Στην εργασία των Poimenova et al (2018), όπου τα συνολικά επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής, προσδιορίστηκαν σε ολόκληρο τον πολφό μέσω αναλύσεων ανοσοσύτωσης (Western blot), δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές, σε συμφωνία με τα ευρήματα της παρούσας εργασίας. Ωστόσο, οι Poimenova et al (2018) έδειξαν μείωση της έκφρασης της ERdj5 στην περιοχή του πολφού εφαρμογής του Prime and Bond, η οποία πιθανότατα να οφείλεται σε εκτεταμένη καταστροφή του ιστού στην περιοχή, ενώ έδειξαν αύξηση στις παρακείμενες περιοχές της εφαρμογής για την ομάδα Prime and Bond και Dycal. Αυτό υποδηλώνει την διαφοροποίηση στις επιδράσεις των παραγόντων αυτών, σε διαφορετικά σημεία του πολφού. Οι ίδιοι έδειξαν ότι το γεγονός αυτό εξηγεί την απουσία σημαντικών διαφορών στα συνολικά επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη των επιπέδων της πρωτεΐνης – δείκτη του αντιοξειδωτικού συστήματος των θειορεδοξινών TRXR1 στα πολφικά κύτταρα. Στην βιβλιογραφία αναφέρεται μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης, σε περιπτώσεις διαταραχής της ισορροπίας των οξειδοαναγωγικών επιπέδων (Tanaka et al 2000, Goy et al 2014). Όσον αφορά την οδοντινοβλαστική στοιβάδα στην περιοχή εφαρμογής, τα αποτελέσματά μας δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της TRXR1 μεταξύ των ομάδων. Οριακά μειωμένα ωστόσο, εμφανίστηκαν τα επίπεδα της ομάδας Clearfil SE ως προς την ομάδα ελέγχου, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα προηγούμενων εργασιών για μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης, σε περιπτώσεις διαταραχής της ισορροπίας των οξειδοαναγωγικών επιπέδων (Tanaka et al 2000, Goy et al 2014).

Ωστόσο, τα αποτελέσματά μας, για το σύνολο του πολφού, έδειξαν ότι η εφαρμογή των παραγόντων προκάλεσε σημαντική αύξηση στα επίπεδα της

πρωτεΐνης TRXR1. Συγκεκριμένα τα επίπεδα της TRXR1, αυξήθηκαν στην πειραματική ομάδα Prime and Bond ως προς την ομάδα ελέγχου, καθώς και ως προς τις ομάδες Clearfil SE και Dycal. Αύξηση παρατηρήθηκε και στα επίπεδα της TRXR1 της ομάδας Clearfil S3 ως προς τις ομάδες Clearfil SE και Dycal. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον διαχωρισμό των φάσεων που υπάρχει στα συγκολλητικά συστήματα, καθώς πραγματοποιείται χρήση συγκολλητικών συστημάτων ως σύνολο και όχι μεμονωμένων συστατικών τους, γεγονός που μπορεί να καταστήσει δύσκολη την εξήγηση των συχνά αντικρουόμενων αποτελεσμάτων που προκύπτουν (Durner et al 2012). Πιο συγκεκριμένα, για την ομάδα Prime and Bond όπου καταγράφεται η μεγαλύτερη αύξηση, καθοριστικής σημασίας μπορεί να είναι η εφαρμογή του φωσφορικού οξέος το οποίο μπορεί να είναι τοξικό για τα κύτταρα του πολφού, διαταράσσοντας έτσι την οξειδοαναγωγική του ισορροπία (Kim et al 2015, Yoshii 1997, Pagoria et al 2005, Morisbak et al 2015).

Οι *in vitro* μελέτες, παρουσιάζουν αρκετούς περιορισμούς σε σχέση με την *in vivo* κατάσταση. Αυτό παρατηρείται ιδιαίτερα στην αλληλεπίδραση των υλικών με τους ζώντες ιστούς. Οι *in vitro* μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες στοχεύουν κυρίως στη μελέτη του βαθμού τοξικότητας ενός υλικού, παρουσιάζοντας την αδυναμία μελέτης της ιστικής αντίδρασης, μιας και η τελευταία εξαρτάται από πολλούς παράγοντες,. Η παρατήρηση από την άλλη πλευρά, της τοξικότητας ενός υλικού, μπορεί να οδηγήσει στην υπόθεση πιθανής πρόκλησης σοβαρού ερεθισμού *in vivo*. Ακόμα, οι *in vitro* μελέτες παρέχουν πληροφορίες για τους κυτταρικούς μηχανισμούς, που ευθύνονται για παράδειγμα για την τοξικότητα, αφού ο αριθμός των πειραματικών παραμέτρων που πρέπει να βρίσκονται υπό έλεγχο σε σχέση με μια *in vivo* μελέτη, είναι περιορισμένος. Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να ακολουθούνται και οι κατάλληλες *in vivo* μελέτες για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Η πραγματοποίηση όμως των *in vivo* μελετών, αποτελεί σκόπελο στις ερευνητικές προσεγγίσεις, από απόψεως δεοντολογίας. Εναλλακτικά, η χρήση *ex vivo* συστημάτων παρουσιάζει πλεονεκτήματα σε σχέση με τις *in vitro* μελέτες (κυτταροκαλλιέργειες), όπως τη διατήρηση της ιστικής ακεραιότητας και του νεύρο – αγγειακού συστήματος, προσομοιάζοντας έτσι περισσότερο στις *in vivo* μελέτες. Στα *ex vivo* συστήματα, πραγματοποιείται συνήθως χρήση είτε ολόκληρων δοντιών, είτε τεμαχιδίων ανθρωπίνων δοντιών σε καλλιέργεια, ευνοώντας έτσι τη μελέτη των επιδράσεων διαφόρων παραγόντων σε

ολόκληρο το οδοντινο - πολφικό σύμπλοκο. Το υλικό μελέτης στην εργασία αυτή, έχει δημιουργηθεί σε ένα *ex vivo* σύστημα τομών ανθρωπίνων δοντιών Poimenova et al (2018,) που προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Magloire et al (1996). Αποτελεί επομένως μια προσέγγιση εγγύτερη προς την *in vivo* κατάσταση.

Συνοψίζοντας, είναι βέβαιο πως πολλά ερωτήματα που αφορούν πιο μακροχρόνιες επιπτώσεις της εφαρμογής συγκολλητικών συστημάτων απευθείας στον πολφό παραμένουν ανοιχτά. Συνεπώς, κρίνεται αναγκαία περισσότερη έρευνα, προκειμένου να αποσαφηνιστεί σε μοριακό επίπεδο, ο επουλωτικός μηχανισμός του πολφού, μετά την άμεση κάλυψή του, καθώς και ο μηχανισμός της κυτταροτοξικότητας των συγκολλητικών συστημάτων.

5. Συμπεράσματα

Με βάση τη μεθοδολογία που ακολουθήθηκε και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα εργασία, μπορούν να εξαχθούν τα παρακάτω συμπεράσματα:

1. Η στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της OPN σε όλες τις ομάδες, στο σύνολο του πολφού αλλά και στην οδοντινοβλαστική στοιβάδα, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, υποδηλώνει πιθανή ενεργοποίηση της επανορθωτικής διαδικασίας του οδοντινο-πολφικού συμπλέγματος.
2. Η απουσία στατιστικά σημαντικών επιπτώσεων στα επίπεδα της πρωτεΐνης ERdj5 στην σύγκριση των ομάδων μεταξύ τους, αλλά και στην σύγκριση των ομάδων ως προς την ομάδα ελέγχου, τόσο στο σύνολο του πολφού όσο και στην οδοντινοβλαστική στοιβάδα, πιθανότατα υποδηλώνει τη μη γενικευμένη τοξικότητα των παραγόντων που εφαρμόστηκαν.
3. Η εφαρμογή του Prime and Bond έπειτα από εφαρμογή του φωσφορικού οξέος (καταστροφική επίδραση στον ιστό) προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης TRXR1. Ακολουθεί η αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης TRXR1, που προκλήθηκε από την εφαρμογή της αυτοαδροποιητικής συγκολλητικής ρητίνης Clearfil S3.
4. Η εφαρμογή του παράγοντα Dycal στο σύνολο των αποτελεσμάτων παρουσίασε μικρότερες αποκλίσεις τόσο σε σχέση με όλες τις πειραματικές ομάδες όσο και την ομάδα ελέγχου με δημιουργία περιορισμένης έκτασης νεκρωτικής ζώνης και ιστικής βλάβης στο σημείο της τοποθέτησής του.

Γ. Περίληψη

Σκοπός: Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξετάσει την ιστική ακεραιότητα και τα επίπεδα κυτταρικού στρες στον πολφό ανθρώπινων δοντιών άμεσα μετά από τοποθέτηση σε αυτόν συγκολλητικών συστημάτων σύνθετων ρητινών (Prime&Bond, Clearfil SE και Clearfil S3) και πάστα υδροξειδίου του ασβεστίου(Dycal).

Μεθοδολογία: Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε τομές κρουστού από πολφό ανθρώπινων δοντιών. Το υλικό αυτό προήλθε από ιστοτεμαχίδια ανθρώπινων δοντιών στα οποία τοποθετηθήκαν οι υπό μελέτη παράγοντες στην διεπιφάνεια πολφού-οδοντίνης και παρέμειναν σε καλλιέργεια για τέσσερις ημέρες. Στις τομές κρουστού πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική εντόπιση τεσσάρων πρωτεϊνών-δεικτών : οστεοποντίνης (OPN), οδοντινικής σιαλοπρωτεΐνης (DSP), πρωτεΐνης του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (Endoplasmic reticulum - (ER) resident protein containing DNA J, DNAJ10 /ERdj5) και αναγωγάσης 1 της θειορεδοξίνης (TRXR1). Ακολούθησε παρατήρηση των τομών στο οπτικό μικροσκόπιο, φωτογράφιση χαρακτηριστικών περιοχών εγγύς και σε απόσταση από το σημείο εφαρμογής των παραγόντων και ποσοτικοποίηση του σήματος της ανοσοϊστοχημείας μέσω κατάλληλου λογισμικού. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με ανάλυση διακύμανσης κατά μία μεταβλητή.

Αποτελέσματα: Τα αποτελέσματα της μελέτης, έδειξαν ότι η επίδραση κάθε εξεταζόμενου παράγοντα ήταν διαφορετική στα πολφικά κύτταρα. Οι κυτταρικές αποκρίσεις στους παράγοντες διέφεραν ως προς την ομάδα ελέγχου, αλλά και μεταξύ τους. Όσον αφορά την OPN, στατιστικά σημαντικές επιπτώσεις, παρατηρήθηκαν τόσο στις περιοχές της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας της μύλης και πέριξ αυτής, όσο και στο σύνολο του πολφού. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της OPN όλων των πειραματικών ομάδων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, με μεγαλύτερη εκείνη της ομάδας υπό την επίδραση του παράγοντα Clearfil SE, για το σύνολο του πολφού, ενώ στατιστικά αύξηση υπήρξε και στις περιοχές της οδοντινοβλαστικής στοιβάδας της μύλης, για τις ομάδες Prime&Bond, Clearfil SE και

Dycal σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Στατιστικά σημαντικές αλλαγές παρατηρήθηκαν στο σύνολο του πολφού για τις πρωτεΐνες-δείκτες κυτταρικού στρες ERdj5 και TRXR1. Σημαντική μείωση της ERdj5 παρατηρήθηκε στην ομάδα Clearfil S3, ως προς την ομάδα ελέγχου, ενώ σημαντική αύξηση της TRXR1 παρατηρήθηκε στην ομάδα Prime&Bond, ως προς την ομάδα ελέγχου. Τα επίπεδα της DSP δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά μεταξύ των ομάδων.

Συμπεράσματα: Τα αποτελέσματα αυτά, υποδεικνύουν την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση των πολύπλοκων μηχανισμών των κυτταρικών αποκρίσεων και των τυχόν αρνητικών επιπτώσεων των υλικών κάλυψης του πολφού.

Δ. Abstract

Aim: The aim of this study was to investigate tissue integrity and cell stress levels, in human dental pulp, immediately after placement of adhesive composite resin systems (Prime&Bond, Clearfil SE και Clearfil S3) and calcium hydroxide paste (Dycal) on it.

Materials and Methods: The study was conducted in cryotome sections of human tooth pulp. These sections derived from tooth slices that were cultured for four days upon the application of the agents under study. We performed immunohistochemistry in cryotome sections of these samples in order to identify the localization and expression levels of the following proteins: osteopontin (OPN), dental sialoprotein (DSP), stress protein of the endoplasmic reticulum (Endoplasmic reticulum - (ER) resident protein containing DNA J, DNAJ10 / ERdj5) and thioredoxin reductase 1 (TRXR1). The pulp areas close and at a distance from the application point were examined under the optical microscope and digitized images were used for quantification of the immunohistochemical signal through appropriate software. The statistical evaluation of the results was done by one way analysis of variable.

Results: The results showed that each agent had different effect in pulp cells. The cellular responses to the applied agents varied, not only compared to the control group, but among the experimental groups as well. Regarding OPN, statistically significant effects were observed both in the areas of the dentinal layer of the tooth crown and around it, as well as in the whole pulp. Specifically, OPN levels in the whole pulp were increased in all experimental groups relative to the control group. The higher increase was detected in the Clearfil SE group. A statistically significant increase was also seen in the area of the dentinal layer for the Prime & Bond, Clearfil SE and Dycal groups relative to the control group. Statistically significant changes were observed in whole pulp for the cellular stress marker proteins ERdj5 and TRXR1. ERdj5 levels were reduced in the Clearfil S3 group compared to the control group, while

TRXR1 levels were increased in the Prime & Bond group relative to the control group. DSP levels did not change significantly among groups.

Conclusions: The results of the present study, indicate the need for further research of the complex mechanisms of cellular responses, as well as the possibly negative effects of pulp capping materials.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abate C, Patel L, Rauscher FJ 3rd, Curran T. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science*. 1990 Sep 7;249(4973):1157-61.
2. Albert B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the cell*. 2014;6th edition.
3. Anelli T & Sitia R. Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO J* 2008;27:315-27.
4. Arner ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*. 2000 Oct;267(20):6102-9.
5. Baba O, Qin C, Brunn JN, Jones JE, Wygant JN, McIntyre BW, Butler WT. Detection of dentin sialoprotein in rat periodontium. *Eur J Oral Sci*. 2004 Apr;112(2):163-70.
6. Baumann A.M., Beer R., *Ενδοδοντολογία. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας. Αθήνα*. 2012;1:2-5.
7. Bellahcène Akeila, Castronovo Vincent, Ogbureke U. E. Kalu , Fisher W. Larry, Fedarko S. Neal . Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2008;8: 212–226
8. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000;49:3-8.
9. Brown L.F. Berse B. Van de Water L. Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell*. 1992;3:1169-1180.
10. Butler WT, Bhowm M, Brunn JD, D'Scouza RN, Farach- Carson MC, Happonen RP, Schrohenloher RE, Seyer JM, Somerman MJ, Foster RA, et al. Isolation, characterization and immunolocalization of a 53-kDa dentin sialoprotein (DSP). *Matrix*. 1992 Nov;12(5):343-51.
11. Camp JH, Barrett EJ, Pulver F. *Pediatric Endodontics: Endodontic treatment for the primary and young, permanent dentition*. Cohen S, Burns RC: *Pathways of the pulp* 8th edition, Mosby Editions. 2002;23:797-844.

12. Cann KL & Hicks GG. Regulation of the cellular DNA double-strand break response. *Biochem Cell Biol.* 2007;85:663-74.
13. Carlson B. Human, embryology and developmental biology. Mosby inc. 1999;Edition 2nd .
14. Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, Nör JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology.* 2011 Jan; 99(1):1-7.
15. 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 hemeoxygenase-1 expression in the cytotoxicity, cell cycle alteration and apoptosis of dental pulp cells induced by BisGMA. *Biomaterials.* 2010;31:8164-71.
16. Cheng Q, Sandalova T, Lindqvist Y, Arnér E. Crystal structure and catalysis of the selenoprotein thioredoxin reductase 1. *J. Biol. Chem.* 2009 Feb;284(6):3998-4008.
17. Costa CAS, 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(4):365-70.
18. Couve E, Osorio R, Schmachtenberg O. The amazing odontoblast: activity, incorporation autophagy, and aging. *J Dent Res.* 2013 Sep;92(9):765-72.
19. Couve E., Ultrastructural changes during the life cycle of human odontoblasts. *Arch Oral Biol.* 1986;31(10):643-51.
20. Cox CF, Tarim B, Kopel H, Gürel G, Hafez A. Technique sensitivity: biological factors contributing to clinical success with various restorative materials. *Adv Dent Res.* 2001;15:85-90.
21. Cunnea PM , Miranda-Vizuete 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.
22. Dammaschke T., The history of direct pulp capping. *J Hist Dent.* 2008 Spring;56(1):9-23.

23. d'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A, Desiderio V, Laino G, Papaccio G. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater.* 2009 Nov 12; (18):75-83.
24. 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.
25. Diamanti E, Mathieu S, Jeanneau C, Kitraki 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.
26. Durner J, Wellner P, Hickel R, Reichl FX. Synergistic interaction caused to human gingival fibroblasts from dental monomers. *Dent Mater.* 2012;28:818-23.
27. Fan Bin, Ying-Jian Sun, Shu-Yan Liu, Lin Che, Guang-Yu Li. Neuroprotective Strategy in Retinal Degeneration: Suppressing ER Stress-Induced Cell Death via Inhibition of the mTOR Signal. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(1), 201.
28. Ferracane L.J. Materials in dentistry – Principles and applications. 1995. Chapter 1.
29. Ferracane JL & Condon JR. Rate of elution of leachable components from composite. *Dent Mater.* 1990;6:282-7.
30. Fisher LW, Fedarko NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res.* 2003;44(1):33-40.
31. Fisher, L.W., Torchia, D.A., Fohr, B., Young, M.F., and Fedarko, N.S. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001;280:460-465.
32. Fujisawa R, Tamura M. Acidic bone matrix proteins and their roles in calcification. *Frontiers in Bioscience.* 2012 Jan 1;17:1891-1903.
33. Gallorini M, Cataldi A, Di Giacomo V. HEMA-induced cytotoxicity: oxidative stress, genotoxicity and apoptosis. *Int Endod J.* 2014;47:813-8.

34. 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.
35. Goldberg M., Askok B. Kulkarni, Marian Young, and Boskey A. Dentin: Structure, Composition and Mineralization. The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*2012; 3: 711–735.
36. Goldberg Michel , Smith J. Anthony . Cells and Extracellular matrices of dentin and pulp: A biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004 January 1: 15 (1): 13-27.
37. Goy C, Czypiorski P, Altschmied J, Jakob S, Rabanter L, Brewer A, Ale-Agha N, Dyballa-Rukes N, Shah A, Haendeler J. The imbalanced redox status in senescent endothelial cells is due to dysregulated Thioredoxin-1 and NADPH oxidase 4. *Exp Gerontol.* 2014 Aug;56:45-52.
38. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev.* Spring 2008; 4(1):21-6.
39. 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.
40. Hafez AA, Cox CF, Tarim B, Otsuki M, Akimoto N. An *in vivo* evaluation of hemorrhage control using sodium hypochlorite and direct capping with a one- or two-component adhesive system in exposed nonhuman primate pulps. *Quintessence Int.* 2002;33:261-272.
41. 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.
42. Halliwell B, Gutteridge JM. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med.* 1985;8(2):89-193.
43. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:51-88.

44. Heyeraas KJ, Sveen OB, Mjor IA. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 3: Pulpal inflammation and its sequelae. *Quintessence Int.* 2001; 32(8);611-25.
45. 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.
46. Huang GJ, 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; 88(9): 792–806.
47. Ingle J, Simon J, Walton R, Pashle D. Pulpal Pathology: its etiology and prevention. *Endodontics*. BC Decker. Editor, 2002, pp.95-174.
48. Jiamu Du, Sheng Hou, Chen Zhong, Zheng Lai, Hui Yang, Jianxin Dai, Dapeng Zhang, Hao Wang, Yajun Guo, Jianping Ding. Molecular Basis of Recognition of Human Osteopontin by 23C3, a Potential Therapeutic Antibody for Treatment of Rheumatoid Arthritis. *J Mol Biol.* 2008 Oct 17; 382(4): 835–842.
49. Jontell M. ,T. Okiji, U. Dahlgren, G. Bergenholtz. Immune Defense Mechanisms of the Dental Pulp. *Crit Rev Oral Biol Med.*1998 April 1;9(2): 179-200.
50. Kaufman R. Stress, signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes and development.* 1999;13:1211-1233.
51. 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.
52. Kirk EE, Lim KC, Khan MO. A comparison of dentinogenesis on pulp capping with calcium hydroxide in paste and cement form. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1989 Aug;68(2):210-9.
53. Kitasako Y, Murray PE, Tagami J, Smith AJ. Histomorphometric analysis of dentinal bridge formation and pulpal inflammation. *Quintessence Int.* 2002;33:600-8.

54. Kober L, Zehe C, Bodez J. Development of a Novel ER stress based selection system for the isolation of highly productive clones. *Biotechnology and Bioengineering*. 2012 Oct;109:2599-611.
55. Lacruz S. Rodrigo, Habelitz Stefan, J. Timothy, Paine L. Michael. Dental Enamel Formation and Implications for Oral Health and Disease *Physiol Rev*. 2017 May;97:939-993.
56. 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.
57. Maegawa Kenichi, Satoshi Watanabe, Kentaro Noi, Masaki Okumura, Yuta Amagai, Michio Inoue, Ryo Ushioda, Kazuhiro Nagata, Teru Ogura, Kenji Inaba. The Highly Dynamic Nature of ERdj5 Is Key to Efficient Elimination of Aberrant Protein Oligomers through ER-Associated Degradation. *Cell press*. June 2017; 25, 6.
58. Magloire H, Joffre A, Bleicher F. An in vitro Model of Human Dental Pulp Repair. *J Dent Res*. 1996; 75(12): 1971-1978.
59. 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.
60. Matthews JR¹, Wakasugi N, Virelizier JL, Yodoi J, Hay RT. Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res*. 1992 Aug 11;20(15):3821-30.
61. Matsuzawa A, Ichijo H. Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Nov;1780(11):1325-36.
62. Medina VO 3rd¹, 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.
63. Mehrazarin S, Oh J, Chung C, Chen W, Kim R, Shi S, Park N, Kang M. Impaired odontogenic differentiation of senescent dental mesenchymal stem cells is associated with loss of Bmi-1 expression. *J Endod*. 2011 May;37(5):662-6.

64. Min KS, Lee HJ, Kim SH, Lee SK, Kim HR, Pae HO, Chung HT, Shin HI, Lee SK, Kim EC. Hydrogen peroxide induces heme oxygenase-1 and dentin sialophosphoprotein mRNA in human pulp cells. *J Endod*. 2008;34:983-989.
65. Mjor IA, Ferrari M. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 6: Reactions to restorative materials, tooth restoration interfaces, and adhesive techniques. *Quintessence Int*. 2002. 33(1);35-63.
66. Mjor IA, Odont D . Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 2: Initial reactions to preparation of teeth for restorative procedures. *Quintessence Int*. 2001. 32(7);537-51.
67. Mjor IA, Sveen OB, Heyeraas KJ . Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: Normal structures and physiology. *Quintessence Int*. 2001. 32(6);427-46.
68. 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.
69. Moule AJ, Li H, Barthold PM. Donor variability in the proliferation of human dental pulp fibroblasts. *Aust Dent J*. 1995 Apr;40(2):110-4.
70. Nanci A. ,Ten Cate's Oral Histology. 2012;8th Edition.
71. Nawfal A. A., Zakarea Talal H. ,Mohamad Amer A. Taqa, Scott Chumbley, Salih Al-Juaid Hanan Balto .A Newly Prepared Solution for the Removal of the Smear Layer. *International Journal of Dental Sciences and Research*, 2014, Vol. 2, No. 1, 19-26.
72. Netter F., Ovalle W., Nahirney P.C. Ιστολογία. Elsevier. 2008;1(12):14-17,270-275.
73. Noort R,V. Introduction to dental materials, Third edition, 2007. Chapter 1& 2.
74. 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;25:91-273.

75. Oldberg A., Franzen A. Heinegard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:8819-8823.
76. Onoe N, Inokoshi S, Yamada T, Fujitani M, Takatsu T. Histopathological evaluation of adhesive resins for direct pulp capping. *Proc Inf Cnf Dent/Pulp'95*. 1995;221-226.
77. Otero JH, Lizák B, Feige MJ, Hendershot LM. Dissection of structural and functional requirements that underlie the interaction of ERdj3 protein with substrates in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2014 Oct 3;289(40):27504-12.
78. 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.
79. Paine, M. L. *et al.* Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein overexpression during amelogenesis. *J Biol Chem* . 2005;280: 31991–31998.
80. 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.
81. Patarca R. ,Saavedra R.A. Cantor H. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Crit Rev Immunol*. 1993;13:225-246.
82. Petridis X, Diamanti E, Trigas GCh, Kalyvas D, Kitraki E. Bone regeneration in critical-size calvarial defects using human dental pulp cells in an extracellular matrix-based scaffold. *J Craniomaxillofac Surg*. 2015 May; 43(4):483-90.
83. Phaneuf RA, Frankl SN, Ruben MP. A comparative histological evaluation of three calcium hydroxide preparations on the human primary dental pulp. *J Dent Child*. 1968 Jan;35(1):61-76.
84. Pisciotta A, Riccio M, Carnevale G, Beretti F, Gibellini L, Maraldi T, Cavallini GM, Ferrari A, Bruzzesi G. Human serum promotes osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *De Pol A PLoS One*. 2012; 7(11):e 50542.

85. 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;109-5641(17)31107-7.
86. Ranly DM, Garcia-Godoy F. Current and potential pulp therapies for primary and young permanent teeth. *J Dent.* 2000;28:153-161.
87. Ritchie Helena, The functional significance of dentin sialoproteinphosphophoryn and dentin sialoprotein. *International Journal of Oral Science.* 2018; 10:31.
88. Rogers Kara . Endoplamic Reticulum. *Encyclopaedia Britannica.* 2014.
89. 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.
90. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* 1998 May 1;17(9):2596-606.
91. Scarano A, Manzon L, Di Giorgio R, Orsini G, Tripodi D, Piattelli A. Direct capping with four different materials in humans: histological analysis of odontoblast activity. *J Endod.* 2003;29:729-734.
92. Schroder M., Kaufman R.J., ER stress and the unfolded protein response. *Mutat. Res.* 2005;569:29–63.
93. 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.
94. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofacial Res.* 2005;8:191-199,.
95. Shibata Y, Voeltz GK, Rapoport TA. Rough sheets and smooth tubules. *Cell.* 2006 Aug 11;126(3):435-9.
96. 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.

97. Smith AJ. Pulpal responses to caries and dental repair. *Caries Res.* 2002; 36(4);223-32.
98. Suzuki, S. *et al.* Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol.* 2009;28: 221–229.
99. Swift EJ, Trope M, Ritter AV. Vital pulp therapy for the mature tooth-can it work? *Endodontic Topics.* 2003;5:49-56.
100. Tanaka T, Nakamura H, Nishiyama A, Hosoi F, Masutani H, Wada H, Yodoi J. Redox regulation by thioredoxin superfamily: protection against oxidative stress and aging. *Free Radic Res* 2000;33:851-855.
101. Thesleff Irma .Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *Journal of Cell Science.* 2003;116:1647-1648.
102. Thomas CG & Spyrou G. ERdj5 sensitizes neuroblastoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2009;284:6282-90.
103. Ushioda R, Nagata K. The endoplasmic reticulum-associated degradation and disulfide reductase ERdj5. *Methods Enzymol* 2011;490:235-58.
104. 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.
105. Wai P.Y. Kuo, P.C. Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer Metastasis.Rev.* 2008;27:103-118.
106. Wang H, Wang X, Ke Z, Comer A, Xu M, Frank J, Zhang Z, Shi X, Luo J. Tunicamycin-induced unfolded protein response in the developing mouse brain. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2014 Dec;283:157-167.
107. Watson WH, Yang X, Choi YE, Jones DP, Kehrer JP. Thioredoxin and its role in toxicology. *Toxicol Sci* 2004;78:3-14.
108. 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.

109. Wentong Li, Lei Chen, Zhuo Chen, Lian Wu, Junsheng Feng, Feng Wang, Lisa Shoff, Xin Li, Kevin J. Donly, Mary MacDougall & Shuo Chen. Dentin sialoprotein facilitates dental mesenchymal cell differentiation and dentin formation. *Sci Rep*. 2017 March;7: 300.
110. Woehrlen AE Jr. Evaluation of techniques and materials used in pulpal therapy based on a review of the literature: part I. *J Am Dent Assoc*. 1977 Dec;95(6):1154-8.
111. Xiao, S, Yu C, Chou X, Yuan W, Wang Y, Bu L, Fu G, Qian M, Yang J, Shi Y, Hu L, Han B, Wang Z, Huang W, Liu J, Chen Z, Zhao G, Kong X. Dentinogenesis imperfecta 1 with or without progressive hearing loss is associated with distinct mutations in DSPP. *Nat Genet*. 2001;27:201–204.
112. Yoshii E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res*. 1997;37:517-24
113. Yu C, Abbott PV. An overview of the dental pulp: Its functions and responses to injury. *Australian Dental Journal*. 2007 April;52(1 Suppl):S4-16. ·
114. Κακάμπουρα Α- Βουγιουκλάκης Γ. Βασικές αρχές οδοντικής χειρουργικής, Εκδόσεις Πασχαλίδης. 2012;1:13-25.
115. Συκαράς Σ. ΕΝΔΟΔΟΝΤΙΑ - Βασικές αρχές .Γ΄ Έκδοση, Τόμος Ι, Ιατρικές Εκδόσεις «Ζήτα» . 2007;15:413-444.
116. Μαρμαράς Β., Μαρμαρά-Λαμπροπούλου Μαρία. Βιολογία Κυττάρου: Μοριακή Προσέγγιση. Έκδοση 5^η Εκδόσεις Τυπογραμα. 2005 Σεπτέμβριος:455.
117. Τζιαφάς Δ. Βιολογία οδοντικών ιστών. Σύσταση, δομή και λειτουργία του οδοντικού πολφού. 1999.