



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Милош Н. Папић

**Терапијски ефекти еритропоетина у
директном прекривању инфламиране
зубне пулпе**

докторска дисертација

Крагујевац, 2022. године



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Miloš N. Papić

Terapijski efekti eritropoetina u direktnom prekrivanju inflamirane zubne pulpe

doktorska disertacija

Kragujevac, 2022. godine



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Milos N. Papic

**Therapeutical effects of erythropoietin in
direct pulp capping of inflamed dental pulp**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2022

Аутор
Име и презиме: Милош Папић
Датум и место рођења: 12.03.1992. године у Крагујевцу
Садашње запослење: асистент за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Терапијски ефекти еритропоетина у директном прекривању инфламиране зубне пулпе
Број страница: 95
Број слика: 5 фигура, 2 слике, 11 графика и 11 табела
Број библиографских података: 272
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: проф. др Милица Поповић, ванредни професор за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, Факултет медицинских наука Универзитет у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 13.12.2019. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: IV-03-473/22 од 15.07.2020. год.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none"> 1. Проф. др Биљана Љујић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, председник; 2. Проф. др Весна Милетић, ванредни професор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Клиничке стоматолошке науке, члан; 3. Проф. др Ирена Танасковић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан.
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: <ol style="list-style-type: none"> 1. Проф. др Биљана Љујић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, председник; 2. Проф. др Ирена Танасковић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан; 3. Проф. др Ивана Радовић, ванредни професор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Клиничке стоматолошке науке, члан.
Датум одбране дисертације:

Autor
Ime i prezime: Miloš Papić
Datum i mesto rođenja: 12.03.1992. godine u Kragujevcu
Sadašnje zaposlenje: asistent za užu naučnu oblast Bolesti zuba i endodoncija, Fakultet medicinskih nauka Univerzitet u Kragujevcu
Doktorska disertacija
Naslov: Terapijski efekti eritropoetina u direktnom prekrivanju inflamirane zubne pulpe
Broj stranica: 95
Broj slika: 5 figura, 2 slike, 11 grafika i 11 tabela
Broj bibliografskih podataka: 272
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac
Naučna oblast (UDK): Medicina
Mentor: prof. dr Milica Popović, vanredni profesor za užu naučnu oblast Bolesti zuba i endodoncija, Fakultet medicinskih nauka Univerzitet u Kragujevcu
Ocena i odbrana
Datum prijave teme: 13.12.2019. godine
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske/umetničke disertacije: IV-03-473/22 od 15.07.2020. god.
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata: <ol style="list-style-type: none"> 1. prof. dr Biljana Ljujić, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Genetika, predsednik; 2. prof. dr Vesna Miletić, vanredni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast Kliničke stomatološke nauke, član; 3. prof. dr Irena Tanasković, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Histologija i embriologija, član.
Komisija za ocenu i odbranu doktorske/umetničke disertacije: <ol style="list-style-type: none"> 1. prof. dr Biljana Ljujić, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Genetika, predsednik; 2. prof. dr Irena Tanasković, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Histologija i embriologija, član; 3. prof. dr Ivana Radović, vanredni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast Kliničke stomatološke nauke, član.
Datum odbrane disertacije:

Author
Name and surname: Milos Papic
Date and place of birth: 12.03.1992. Kragujevac
Current employment: assistant, Department of Dentistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: Therapeutical effects of erythropoietin in direct pulp capping of inflamed dental pulp
No. of pages: 95
No. of images: 5 figures, 2 images, 11 graphs and 11 tables
No. of bibliographic data: 272
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine
Mentor: Assoc. prof. Milica Popovic, Associate Professor, Department of Dentistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 13.12.2019.
Decision number and date of acceptance of the doctoral / artistic dissertation topic: IV-03-473/22 from 15.07.2020.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: <ul style="list-style-type: none"> 1. Assoc. prof. Biljana Lujic, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrow scientific field of Genetics, President; 2. Assoc. prof. Vesna Miletic, Associate Professor at the School of Dental Medicine, University of Belgrade, for the narrow scientific field of Clinical Dental Sciences, member; 3. Assoc. prof. Irena Tanaskovic, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrow scientific field of Histology and Embryology, member.
Commission for evaluation and defense of doctoral / artistic dissertation: <ul style="list-style-type: none"> 1. Assoc. prof. Biljana Lujic, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrow scientific field of Genetics, President; 2. Assoc. prof. Irena Tanaskovic, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrow scientific field of Histology and Embryology, member; 3. Assoc. prof. Ivana Radovic, Associate Professor at the School of Dental Medicine, University of Belgrade, for the narrow scientific field of Clinical Dental Sciences, member.
Date of Dissertation Defense:

Посебну захвалност дугујем својој менторки, проф. др Милици Поповић на пријатељству, знању, подрици и несебичној помоћи у свим фазама израде докторске дисертације.

Захвалност за подрику, савете и огромну помоћ у експерименталном раду дугујем проф. др Биљани Љујић и њеном истраживачком тиму.

Захваљујем се проф. др Владимиру Јаковљевићу и проф. др Владимиру Живковићу што су ми пружили експериментални рад у слободном и пријатељском окружењу.

Велику захвалност дугујем колегама са Института за информационе технологије Универзитета у Крагујевцу, посебно Др Марку Живановићу и маг. фарм. спец. Невени Миливојевић на несебичној помоћи у експерименталном раду.

Захваљујем се својим пријатељима, професорима и колегама са Катедре за стоматологију на разумевању и подрици током израде докторске дисертације.

Посебну захвалност дугујем др сци. мед. Сузани Живановић на огромној подрици и пријатељству и несебичној помоћи утканој у све фазе израде ове докторске дисертације.

Захваљујем се својој породици на разумевању, љубави, подрици и стрпљењу током израде докторске дисертације. Ову докторску дисертацију посвећујем њима.

Мири и Валентини...

САЖЕТАК

Увод Директно прекривање представља постављање одређених материјала на место експонирања пулпе како би се одржао њен виталитет. Стопа успеха терапије значајно се умањује ако се спроводи на претходно инфламираној зубној пулпи. Еритропоетин (ЕРО) је главни стимулатор еритропоезе, али постојећа сазнања указују да може остварити различите повољне ефекте у репарацији оштећених ткива.

Циљ Испитивање експресије еритропоетина и еритропоетинског рецептора у експонираној и директно прекривеној пулпи и испитивање ефеката еритропоетина на инфламацију и репараторну дентиногенезу у терапији директним прекривањем инфламиране зубне пулпе.

Материјал и методе Индукована је инфламација експонирањем пулпе првих максиларних молара пацова на 48 сати, а затим директно прекривање применом rhЕРО, Са(ОН)₂, МТА или МТА+rhЕРО. Као контроле коришћене су експонирана непрекривена (ЕС) и здрава зубна пулпа (НС). Спроведене су имунохистохемијска, хистолошка, РСР и спектрофотометријска анализа. Добијени подаци су обрађени статистички.

Резултати ЕС група имала је највишу експресију ЕРО-Р, док је прекривање применом Са(ОН)₂ или МТА довело до повећања експресије ЕРО. Директно прекривање умањило је експресију проинфламаторних цитокина и повећало експресију имунорегулаторних цитокина у односу на ЕС групу. Примена МТА+rhЕРО довела је до повећања експресије маркера одонтобласте активности у односу на ЕС групу. Примена препарата који садрже rhЕРО умањила је вредности прооксидативних параметара у односу на ЕС групу.

Закључак ЕРО и ЕРО-Р експримирани су у експонираној и директно прекривеној зубној пулпи. ЕРО може бити погодан за примену у терапији директним прекривањем пулпе јер умањује степен инфламације и стимулише репараторну дентиногенезу, остварујући ефекат сличан уобичајено коришћеним материјалима.

Кључне речи: еритропоетин, директно прекривање пулпе, калцијум хидроксид, минерал триоксид агрегат, запаљење пулпе

ABSTRACT

Introduction Direct pulp capping presents placing of certain materials on exposure site in order to preserve its vitality. The success rate of this therapy is significantly reduced if it is performed on previously inflamed dental pulp. Erythropoietin (EPO) is the main stimulator of erythropoiesis, but the existing literature indicates that it could have various beneficial effects on repair of damaged tissues.

Aim To investigate the expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in pulp exposure and direct pulp capping and to investigate the effects of erythropoietin on inflammation and reparative dentinogenesis in direct capping of inflamed dental pulp.

Material and methods Pulp inflammation was induced by exposing the pulp of rats' maxillary first molars for 48 h, followed by capping using rhEPO, Ca(OH)₂, MTA or MTA+rhEPO. Noncapped exposed pulp (EC) and healthy pulp (HC) were used as controls. Immunohistochemical, histological, PCR and spectrophotometric analysis were performed. Acquired data was analyzed statistically.

Results EC group had the highest expression of EPO-R, while capping with Ca(OH)₂ or MTA led to increased EPO expression. Direct pulp capping decreased the expression of pro-inflammatory and increased the expression of immunoregulatory cytokines compared to EC group. Capping with MTA+rhEPO led to increased expression of odontoblast activity markers compared to EC group. Capping with the rhEPO-containing materials reduced the values of pro-oxidative parameters compared to EC group.

Conclusion EPO and EPO-R are expressed in exposed and capped dental pulp. EPO can be suitable for direct pulp capping because it reduces the degree of inflammation and stimulates the reparative dentinogenesis, having similar effects to commonly used materials.

Key words erythropoietin, direct pulp capping, calcium hydroxide, mineral trioxide aggregate, pulp inflammation

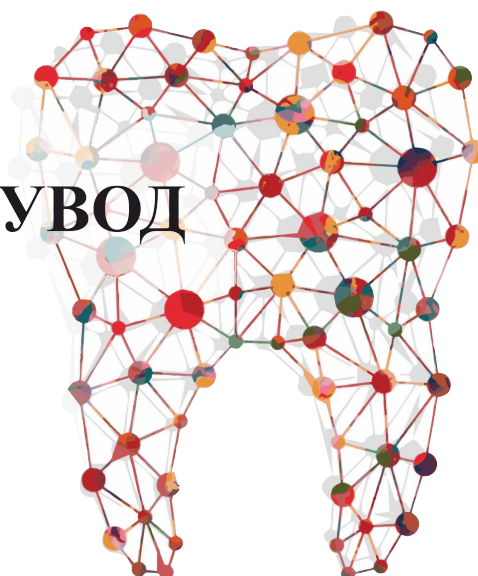
САДРЖАЈ

1. УВОД	2
1.1 ПУЛПО-ДЕНТИНСКИ КОМПЛЕКС	2
1.1.1. Развој пулпо-дентинског комплекса	2
1.1.2. Зубна пулпа.....	4
1.1.3. Функције пулпе	8
1.2 РЕАКЦИЈА ПУЛПЕ НА ЕКСПОНИРАЊЕ	8
1.3 ДИРЕКТНО ПРЕКРИВАЊЕ ПУЛПЕ	11
1.3.1 Индикације за директно прекривање пулпе	11
1.3.2 Зарастање пулпне ране након директног прекривања	12
1.3.2.1 Молекуларни чиниоци зарастања пулпне ране.....	13
1.3.3 Материјали за директно прекривање пулпе	17
1.3.3.1 Калцијум хидроксид	17
1.3.3.2 Калцијум силикатни цементи	18
1.3.4 Успешност директног прекривања	19
1.4 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛИ ДИРЕКТНОГ ПРЕКРИВАЊА	20
1.5 ЕРИТРОПОЕТИН	22
1.5.1 Функције ЕРО.....	23
1.5.2 Експресија ЕРО и ЕРО-R у ткивима	24
1.5.3 Ефекти ЕРО изван хематопоезе.....	25
1.5.3.1 Ткивно-заштитни рецептор	25
1.5.4 Терапијски ефекти ЕРО.....	26
2. ЦИЉ СТУДИЈЕ	28
2.1 РАДНЕ ХИПОТЕЗЕ	28
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	30
3.1 ЕТИЧКО ОДОБРЕЊЕ	30
3.2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ	30
3.2.1 Снага студије и величина узорка.....	30
3.3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО ЕКСПОНИРАЊЕ И ДИРЕКТНО ПРЕКРИВАЊЕ ПУЛПЕ	30
3.3.1 Груписање експерименталних животиња.....	31
3.3.2 Жртвовање експерименталних животиња и прикупљање узорака.....	31
3.4 ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА	32
3.4.1 Фиксација и парафинизација ткивних узорака	32
3.5 ХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА	33
3.5.1 Бојење ткивних исечака хематоксилин-еозином (H/E).....	33
3.5.2 Евалуација инфламације и минерализације зубне пулпе.....	33

3.6	АНАЛИЗА ТКИВНЕ ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА МЕТОДОМ КВАНТИТАТИВНЕ ЛАНЧАНЕ РЕАКЦИЈЕ ПОЛИМЕРАЗЕ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ	36
3.7	БИОХЕМИЈСКО ОДРЕЂИВАЊЕ СИСТЕМСКИХ ПРООКСИДАТИВНИХ И АНТИОКСИДАТИВНИХ ПАРАМЕТАРА	38
3.7.1	Одређивање индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS)	38
3.7.2	Одређивање нитрита (NO_2^-)	38
3.7.3	Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)	39
3.7.4	Одређивање водоник пероксида (H_2O_2).....	39
3.7.5	Одређивање каталазе (CAT)	39
3.7.6	Одређивање супероксид дисмутазе (SOD).....	39
3.7.7	Одређивање редукованог глутатиона (GSH).....	39
3.8	СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА	40
4.	РЕЗУЛТАТИ	42
4.1	ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ ЕРО И ЕРО-Р У ЕКСПОНИРАНОЈ И ДИРЕКТНО ПРЕКРИВЕНОЈ ПУЛПИ	42
4.2	ХИСТОЛОШКА ЕВАЛУАЦИЈА ЗУБНЕ ПУЛПЕ НАКОН ЕКСПОНИРАЊА И ДИРЕКТНОГ ПРЕКРИВАЊА	44
4.2.1	Квантификација хистолошких резултата	45
4.3	АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈА ГЕНА У ЕКСПОНИРАНОЈ И ДИРЕКТНО ПРЕКРИВЕНОЈ ПУЛПИ	47
4.3.1	Ткивна експресија ЕРО и ЕРО-Р у експонираној и директно прекривеној пулпи	47
4.3.2	Ткивна експресија цитокина у експонираној и директно прекривеној пулпи	49
4.3.2.1	Односи релативних експресија проинфламаторних и имунорегулаторних цитокина у експонираној и директно прекривеној пулпи ...	54
4.3.3	Ткивна експресија маркера одонтобластне активности у експонираној и директно прекривеној пулпи	58
4.3.4	АНАЛИЗА ЕФЕКТА ЕКСПОНИРАЊА И ДИРЕКТНОГ ПРЕКРИВАЊА ЗУБНЕ ПУЛПЕ НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА	60
4.3.5	Утицај експонирања и директног прекривања зубне пулпе на прооксидативне параметре у узорцима крви	60
4.3.6	Утицај експонирања и директног прекривања зубне пулпе на антиоксидативне параметре у узорцима крви	62
5.	ДИСКУСИЈА	65
5.1	Експресија ЕРО и ЕРО-Р у ткиву зубне пулпе.....	65
5.2	Ефекти препарата који су садржали rhЕРО на параметре инфламације зубне пулпе	67

5.3	Ефекти препарата који су садржали гНЕРО на параметре минерализације зубне пулпе	72
5.4	Ефекти препарата за директно прекривање на параметре оксидативног стреса	73
6.	ЗАКЉУЧАК.....	76
7.	ЛИТЕРАТУРА.....	79

1. УВОД



1. УВОД

Зубна пулпа представља централну везивно-ткивну компоненту зуба. Уобичајено, зубна пулпа заштићена је од спољашњих надражаја околним минерализованим дентином са којим чини анатомску и функционалну целину. Међутим, као последица трауме, каријеса или јатрогено, препарације, зубна пулпа може бити експонирана и постати подложна микробиолошкој колонизацији што представља основ за развој запаљења и некрозе (1). Како би се затворио дефект настао експонирањем и очувао интегритет зубне пулпе, спроводи се терапијски поступак назван **директно прекривање пулпе** (2).

Директно прекривање пулпе уобичајено се спроводи постављањем материјала на бази калцијум хидроксида или калцијум силикатних цемената који промовишу репараторне процесе у зубној пулпи уз изостанак запаљења (3). Стопа успеха овог вида терапије значајно се умањује ако је директно прекривање спроведено на претходно инфламираној зубној пулпи, посебно имајући у виду да су најчешће коришћени материјали јако базна једињења са каустичним својствима (4,5).

Из овог разлога, покушано је да се постојећи материјали замене или оплемене биомолекулима који би деловали антиинфламаторно и уједно поспешили репарацију и регенерацију ткива (6). Еритропоетин (енг. *erythropoietin*, ЕРО) може бити један такав биомолекул. ЕРО је основни стимулатор еритропоезе делујући преко рецептора (ЕРО-Р) на диференцијацију прогениторских ћелија црвене крвне лозе (7). Присуство ЕРО-Р пронађено је на различитим нехематопоетским ћелијама, укључујући и хуману зубну пулпу, доводећи до разматрања да ЕРО, био ендогеног или егзогеног порекла, остварује различите функције у ткивима, што је истраживањима и доказано (8,9).

ЕРО у различитим ткивима делује антиинфламаторно, стимулише ангиогенезу, промовише оксигенацију и диференцијацију прогениторских и матичних ћелија датог ткива како би извршиле репарацију (10). Међутим, обрасци експресије ендогеног ЕРО и могући ефекти терапијске примене егзогеног ЕРО у директном прекривању инфламиране зубне пулпе нису до сада испитивани.

1.1 ПУЛПО-ДЕНТИНСКИ КОМПЛЕКС

Зуб је сачињен од минерализованог чврстог ткива, глеђи, дентина и цемента. Глеђ и цемент прекривају површине зубне круне и корена, док дентин сачињава највећи унутрашњи део зуба. У средишњем делу зуба, потпуно окружена дентином налази се зубна пулпа која представља васкуларизовано и инервисано везивно ткиво. Због свог блиског анатомског и функционалног односа са дентином развијен је термин „**пулпо-дентински комплекс**“. Овај термин прикладан је и због заједничког ембрионалног порекла пулпе и дентина у развоју зуба (11).

1.1.1. Развој пулпо-дентинског комплекса

Развој зуба дешава се истоветно са почетним стадијумима краниофацијалног развоја и регулисан је интеракцијом епитела и мезенхима. Зубна ткива воде порекло од два ембрионална кличина листа, ектодерма и мезенхима првог фарингеалног лука.

Мезенхим првог фарингеалног лука назива се ектомезенхим јер потиче од ектодерма, односно ћелија нервног гребена (12). У шестој недељи ембрионалног развоја, ћелије базалног слоја оралног епитела пролиферишу формирајући траку – **примарну зубну гредицу**, која је облика потковице и прекрива мандибуларни и максиларни наставак. Око седме недеље, примарна епителна трака се дели на унутрашњу (лингвалну) траку названу **дентална ламина** и спољашњу траку названу **вестибуларна ламина**. Дентална ламина представља основу за формирање прво млечних, а затим и сталних зуба у човека. Убрзаном пролиферацијом ћелија денталне ламине и њиховом инвагинацијом према мезенхиму виличних наставака, ствара се **зубни пупољак**. Ова структура денталне ламине, порекла оралног епитела, представља почетак формирања **глеђног органа**. Даљом пролиферацијом ћелија и њиховим растом према ектомезенхиму, глеђни орган мења свој облик и поприма различите хистолошке облике, према којима је развој зуба подељен у више стадијума (стадијум пупољка, капе и звона) (13).

У стадијуму капе долази до задебљања глеђног органа, његове инвагинације и јасног разграничавања спољашњег и унутрашњег глеђног епитела. Део ектомезенхима који се налази одмах испод глеђног органа и који је одвојен танким ацелуларним слојем екстрацелуларног матрикса у форми базалне мембране (*membrana preformativa*) од унутрашњег глеђног епитела - чини **зубну папилу**. Она представља формативни орган дентина и основу за развој зубне пулпе: од периферних ћелија зубне папиле диферентују одонтобласти који синтетишу органску компоненту дентина – **предентин**, након чега следи његова минерализација. Новоформирани дентин „инкапсулира“ ткиво зубне папиле чиме она постаје зубна пулпа (13).

Иницијални сигнал за процес диференцијације одонтобласта, а тиме и процес формирања пулпо-дентинског комплекса представља близак контакт унутрашњег глеђног епитела и ектомезенхима зубне папиле, тзв. **епително-мезенхимна интеракција** (12). У касном стадијуму звона, унутар глеђног органа формира се накупина ћелија звана глеђни чвор. Ова формација има важну улогу у преносу сигналних молекула кроз унутрашњи глеђни епител сачињен од преамелобласта, иницирајући диференцијацију периферних ћелија зубне папиле у примарне одонтобласте. Одонтобласти се по диференцијацији постепено одвајају од базалне мембране стварајући карактеристичан цитоплазматски продужетак. Упоредо, преамелобласти диферентују у амелобласте, ћелије које синтетишу органску компоненту глеђи. Почетак секреције дентинског матрикса од стране новодиферентованих одонтобласта стимулише амелобласте да секретују глеђни матрикс. Неопходност интеракције глеђног органа и зубне папиле у формативним фазама развоја зуба показана је чињеницом да се глеђ неће формирати ако нема дентина, а формирање дентина се неће догодити ако се епителне ћелије не диферентују у амелобласте (12,14). Сви наведени процеси су генетски детерминисани и праћени спектром сигналних молекула. Иако се диференцијација одонтобласта у пределу корена зуба одвија на сличан начин као у круници, изостаје диференцијација амелобласта због одсуства стелатног ретикулума и његових сигналних молекула.

Велики број фактора раста, сигналних молекула и путева удружено делују у развоју зуба, а своје дејство остварују спровођењем сигнала у интеракцији епитела и ектомезенхима. Коштани морфогенетски протеин (енг. *bone morphogenetic protein*, BMP), трансформишући фактор раста (енг. *transforming growth factor*, TGF), фактор раста фибробласта (енг. *fibroblast growth factor*, FGF), WNT и Hh (енг. *hedgehog*) сигнални путеви само су неки од фактора укључених у развој зуба (12–15). Сви они

своје активности остварују активацијом неког од транскрипционих фактора који ће промовисати транскрипцију гена специфичних за одонтогенезу. До сада најпознатији транскрипциони фактори укључени у одонтогенезу су *Msx1*, *Msx2*, *Pax9*, *Lhx6*, *Lhx7*, *Dlx1*, *Dlx2*, и *Runx2* (12,13). За BMP4 се сматра да је носилац одонтогеног потенцијала, који у фази капе и звона преноси са епителних на мезенхималне ћелије. У *in vitro* условима показано је да се додавањем BMP4 на изоловани зубни мезенхим постиже његова активацију у смеру убрзане пролиферације и диференцијације (15).

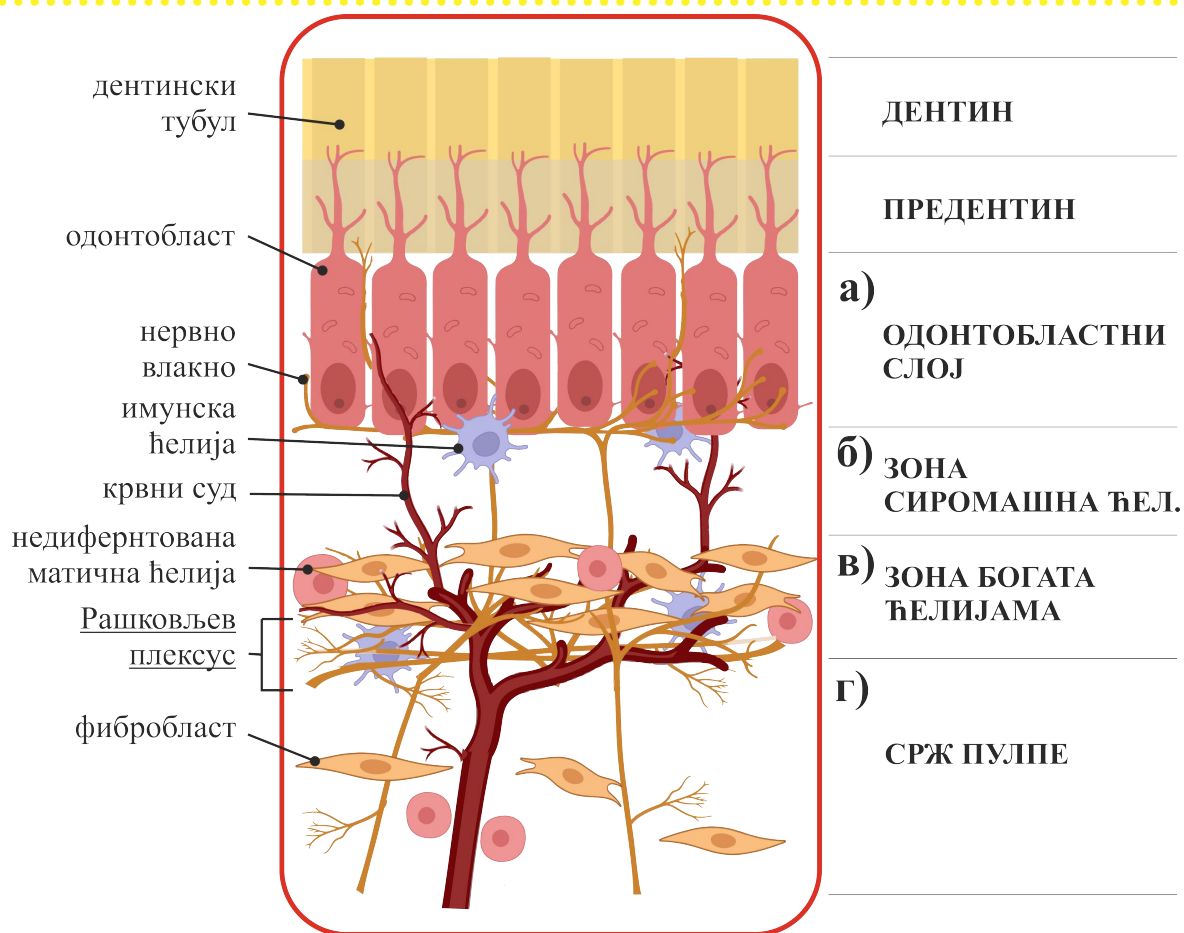
1.1.2. Зубна пулпа

Зубна пулпа представља богато васкуларизовано и инервисано везивно ткиво пореклом од ектомезенхима. Поред тога, зубна пулпа је окружена околним дентином и комуницира са периодонцијумом. Термин „пулпа“ потиче од латинске речи која означава средишњи и мекани део ткива животиња и биљака (13). С обзиром на своју анатомску, развојну и функционалну повезаност са дентином, ткиво зубне пулпе одговара на оштећење дентина иако није директно стимулисано (16)

Пулпа испуњава зубну шупљину (*cavum dentis*) која се назива **пулпна комора** у круничном делу и **канал корена** у коренском делу зуба. Према топографској подели коморе и сама зубна пулпа подељена је на крунични и коренски део. Морфолошки облик пулпе осликава облик зуба у коме се налази, што се најбоље уочава у круничној пулпи младих особа. На круничној пулпи се разликују шест страна, мезијална, дистална, букална, лингвална, кров и под, као и пулпни рогови који најчешће одговарају позицији квржица на круници зуба. У вратном делу крунична пулпа се сужава и наставља на пулпу у каналу корена. Број и морфолошки облик канала коренова је различит у зависности од групе зуба (17,18). Коренска пулпа преко апикалног отвора и латералних комуникација комуницира са везивним ткивом пародонцијума (13).

Као везивно ткиво, зубна пулпа састоји се од 75% воде и 25% органске материје коју чине ћелије, међућелијска супстанца, влакана, ткивна течност, крвни и лимфни судови и нервна влакна. Најбројнија група ћелија су фибробласти, затим одонтобласти, имунске ћелије и зубне матичне ћелије (19). Хистолошки, идући од унутрашњости ка периферији, зубна пулпа може се поделити на (**Фигура 1.**):

1. Срж пулпе
2. Зону богату ћелијама
3. Зону сиромашну ћелијама
4. Одонтобластни слој



Фигура 1. Схематски приказ периферне зоне зубне пулпе. Идући од дентина, преко слоја предентина, на периферији пулпе уочавају се: а) одонтобластни слој; б) зона сиромашна ћелијама (Вејлова зона); в) зона богата ћелијама, у којој се уочава и формирани сплет нервних влакана (Рашковљев плексус) и; г) срж пулпе, као централни део пулпног ткива.

Срж пулпе

Срж пулпе сачињавају основна супстанца са влакнима, крвни и лимфни судови, нервна влакна и ћелије од којих су најбројнији фибробласти.

Основна супстанца зубне пулпе представља аморфну желатинозну масу макромолекула која испуњава екстрацелуларни простор и омогућава адхезију ћелија и влакана унутар екстрацелуларног матрикса. Сачињавају је колагена влакна, гликозаминогликани, протеоглици и гликопротеини. Од колагених влакана најзаступљенија су влакна колагена тип I, али је доказано и присуство колагена III, V, VI и XI. У сржи пулпе присутни су гликозаминогликани (хијалуронска киселина, дерматан сулфат и хондроитин сулфат), као и молекули протеогликана, састављени од централног протеинског средишта и ланаца сулфатисаних гликозаминогликана. Од гликопротеина, свеprisутан је фибронектин, који има улогу у пролиферацији, диференцијацији и организацији одонтобласти (20).

Зубна пулпа је веома васкуларизовано ткиво. Крвни судови величине артериола и венула улазе/напуштају пулпну комору кроз апикални отвор, док мањи крвни судови могу комуницирати са пулпном комором кроз латералне канале. Крвни судови праћени су сензитивним и симпатичким нервним влакнима. По улазу у пулпно ткиво, артериоле повећавају дијаметар свог лумена уз смањење дебљине зида. Пролазећи кроз коренску

пулпу, гранају се на мање крвне судове који формирају капиларну мрежу у субодонтобластном слоју, обезбеђујући добру исхрану одонтобластима (**Фигура 1.г**) (21,22). У здравој зубној пулпи, васкуларни тонус контролишу нервни, паракрини и ендокрини стимулуси (23).

Зубна пулпа садржи сензитивна и симпатичка нервна влакна која имају вазомоторну и одбрамбену (заштитну) функцију. Сензитивни нерви задужени су за перцепцију и пренос бола и потичу од максиларне и мандибуларне гране тригеминалног нерва. Слично као и крвни судови, већа нервна влакна изразито се гранају идући ка периферији пулпног ткива стварајући богату инервациону мрежу у регији зоне богате ћелијама назван **Рашковљев (Raschkow) плексус (Фигура 1.в)**. Овај плексус садржи и већа мијелизована А-делта влакна и мања немијелизована С-влакна. Мијелизована нервна влакна губе свој мијелински омотач идући ка зони сиромашној ћелијама, а затим улазе и зону одонтобласта пружајући се све до предентина уз одонтобластни продужетак. Аутономна нервна влакна зубне пулпе потичу од цервикалног симпатичког ганглиона и најважнија улога им је контрола вазодилатације путем норадреналина и неуропептида Y (24).

Зона богата ћелијама

Зона богата ћелијама наставља се на срж пулпе. Садржи фибробласте, имунске ћелије и недиферентоване матичне ћелије зубне пулпе (**Фигура 1.в**). Сматра се да настаје као резултат периферне миграције ћелија из средишњих делова пулпе у периоду ерупције зуба. Такође, у случајевима антигенских изазова, ова зона бива насељена већим бројем имунокомпетентних ћелија. Митотска активност у овој зони је ниска, осим у случајевима губитка одонтобластног слоја (25).

Фибробласти су најбројније ћелије зубне пулпе, а њихово присуство се највише уочава у зони богатој ћелијама (**Фигура 1.в**). То су издужене звездасте ћелије са добро развијеним органелама синтетског пута и еухроматским једром са израженим нуклеолусом. Њихова основна функција је синтеза и одржавање влакана и основне супстанце зубне пулпе. Фибробласти синтетишу различите компоненте екстрацелуларног матрикса као што су колаген тип I и III, еластин, фибронектин, гликозаминогликани, али и цитокини, фактори раста и протеиназе. Такође, спроводе ремоделацију везивног ткива кроз деградацију и поновну синтезу колагених компоненти (26). Фибробласти могу да спроводе и протеолитичку активност синтезом матриксних металопроотеиназа (енг. *matrix metalloproteinase*, MMP), као и да поседују имуномодулаторну функцију учествовањем у презентацији антигена и синтези цитокина (27,28).

Имунокомпетентне ћелије урођене и стечене имуности присутне су у пулпном ткиву. Најбројнији су макрофаги, дендритске ћелије и Т лимфоцити. Значајан број антиген-презентујућих ћелија у здравом ткиву пулпе имају улогу у „надгледању“ ткива у потрази за патогенима. У случајевима детекције, долази до повећања њиховог броја унутар пулпе. Макрофаги у здравом пулпном ткиву такође имају улогу у елиминацији апоптотских тела и оштећених ћелија. И помоћнички и цитотоксични Т лимфоцити присутни су у здравој зубној пулпи, док се В лимфоцити у њој не могу пронаћи (1).

У овој зони посебно, али и у сржи пулпе, налази се велики број недиферентованих мезенхимских ћелија другачије назване **матичне ћелије зубне пулпе** (енг. *dental pulp stem cells*, DPSC) (**Фигура 1.**). У случају нестанка примарних одонтобласта, услед пенетрације каријеса у пулпно ткиво или јатрогеног уништења

дентинског зида пулпне коморе, DPSC су способне да диферентују у ћелије сличне одонтобластима тзв. **секундарне одонтобласте**. Њихово порекло било је тема дебате претходних деценија. Поједини аутори сматрају да секундарни одонтобласти настају диференцијацијом или перицита, ћелија у спољашњем слоју зида капилара и посткапиларних венула или фибробласта (14). Међутим, изолација културе мезенхималних матичних ћелија из зубне пулпе 2000. године, усмерила је становиште о пореклу секундарних одонтобласта ка DPSC (29). DPSC су способне да мигрирају ка месту уништених одонтобласта, диферентују и секретују дентински матрикс и минерално ткиво како би надокнадили недостатак дентина (14,29). На активности ових ћелија заснива се репараторни и регенеративни процес који се дешава услед директног прекривања експониране зубне пулпе.

Зона сиромашна ћелијама

Другачије названа Вејлова (*Weil*), зона сиромашна ћелијама налази се између зоне богате ћелијама и одонтобластног слоја и карактерише је присуство малог броја ћелија (**Фигура 1.б**). Међутим, у овој зони налазе се субодонтобластни сплет немијелизованих нервних влакна, крвни капилари и продужеци фибробласта (20). Поједини аутори сматрају да је ова зона само артефакт фиксације ткива приликом хистолошке анализе, док други сматрају да ова зона представља простор у који могу да мигрирају одонтобласти приликом секреције реактивног дентина (24).

Одонтобластни слој

Одонтобластни слој сачињен је од четири до пет редова палисадно распоређених одонтобласта карактеристичног издуженог облика са цитоплазматским продужецима (Томесова влакна) који улазе у тубуле дентина (**Фигура 1.а**). Како су ове ћелије у непосредном контакту са минерализованим чврстим ткивом дентина, имају важне улоге у одбрани, те им се приписују и функције ноцицептора и антиген-презентујућих ћелија. Показано је да бактерије и њихови производи могу бити препознати од стране рецептора TLR (енг. *Toll-like receptors*) на одонтобластима што их стимулише да започну продукцију антимикуробних агенаса као што су β -дефензини, азот оксид (енг. *nitrous oxide*, NO), хемокини (CCL2, CXCL1, CXCL2 и др.) и проинфламаторних цитокина. Међутим, њихова главна улога је продукција дентина у току развоја зуба, али и током живота као одговор на различите стимулусе (30,31). Примарни одонтобласти су дугоживеће пост-митотске ћелије те се не могу умножавати деобом. У случају њихове апоптозе бивају замењене секундарним одонтобластима порекла диферентованих DPSC (14).

Уз одонтобластни слој, описује се суб-одонтобластни слој сачињен примарно од недиферентованих пре-одонтобласта назване Хохлове (*Höhl*) ћелије. Сматра се да ове ћелије настају у фази диференцијације ектомезенхималних ћелија зубне папиле у одонтобласте под утицајем сигнала унутрашњег глеђног епитела. Поједине ћелије на периферији зубне папиле не ступају у комуникацију са унутрашњим глеђним епителом те остају недиферентоване и смештене у суб-одонтобластном слоју (32).

1.1.3. Функције пулпе

Зубна пулпа као комплексно везивно ткиво остварује различите улоге од којих се издвајају нутритивна, заштитна, сензорна и формативна.

Нутритивна - учествује у исхрани, очувању хомеостазе и виталности;

Формативна – учествује у стварању дентина;

Заштитна – штити зуб склерозом дентина и стварањем секундарног и терцијарног дентина;

Сензорна – региструје оштећења, притисак, промене температуре.

Нутритивна функција обезбеђена је добром васкуларизацијом пулног ткива које преко своје капиларне мреже и комуникације одонтобласта са тубулима спроводи исхрану дентина. Сензорна улога зубне пулпе обезбеђена је сензитивном и симпатичком инервацијом ткива. Зуб посредством инервације пулпе реагује болном сензацијом на различите надражаје (топло, хладно, притисак, препарација и хемијски надражаји), изазивајући рефлексне механизме, а уз додатак симпатичке контроле, регулише се циркулација у пулпном ткиву (13).

Формативна улога огледа се у способности зубне пулпе да посредством одонтобласта синтетише органски дентински матрикс, а затим учествује у његовој минерализацији. Примарни одонтобласти у фазама развоја зуба стварају предентин, структуру неминерализованог дентина састављену највише од колагена тип I и III, али и протеогликана и других не-колагених протеина. Дентин сијалофосфопротеин (енг. *dentine sialophosphoprotein*, DSPP), протеин дентинског матрикса-1 (енг. *dentine matrix protein-1*, DMP-1), остеопонтин (енг. *osteopontin*, OPN) и остеокалцин (енг. *osteocalcin*, OCN) само су неки од најважнијих протеина дентинског матрикса. Формативна улога одонтобласта подржана је многим факторима раста порекла од денталне папиле и глеђног органа, а сами фактори остају уграђени у органски матрикс током живота. У органском матриксу дентина показано је присуство фактора раста из породица TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3), BMP (BMP-2, BMP-4, BMP-7), FGF (FGF-2), фактора раста сличног инсулину (енг. *insulin-like growth factor*, IGF) (IGF-1, IGF-2), али и фактор раста порекла тромбоцита (енг. *platelet-derived growth factor*, PDGF), фактор раста васкуларног ендотела (енг. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) и др. (14).

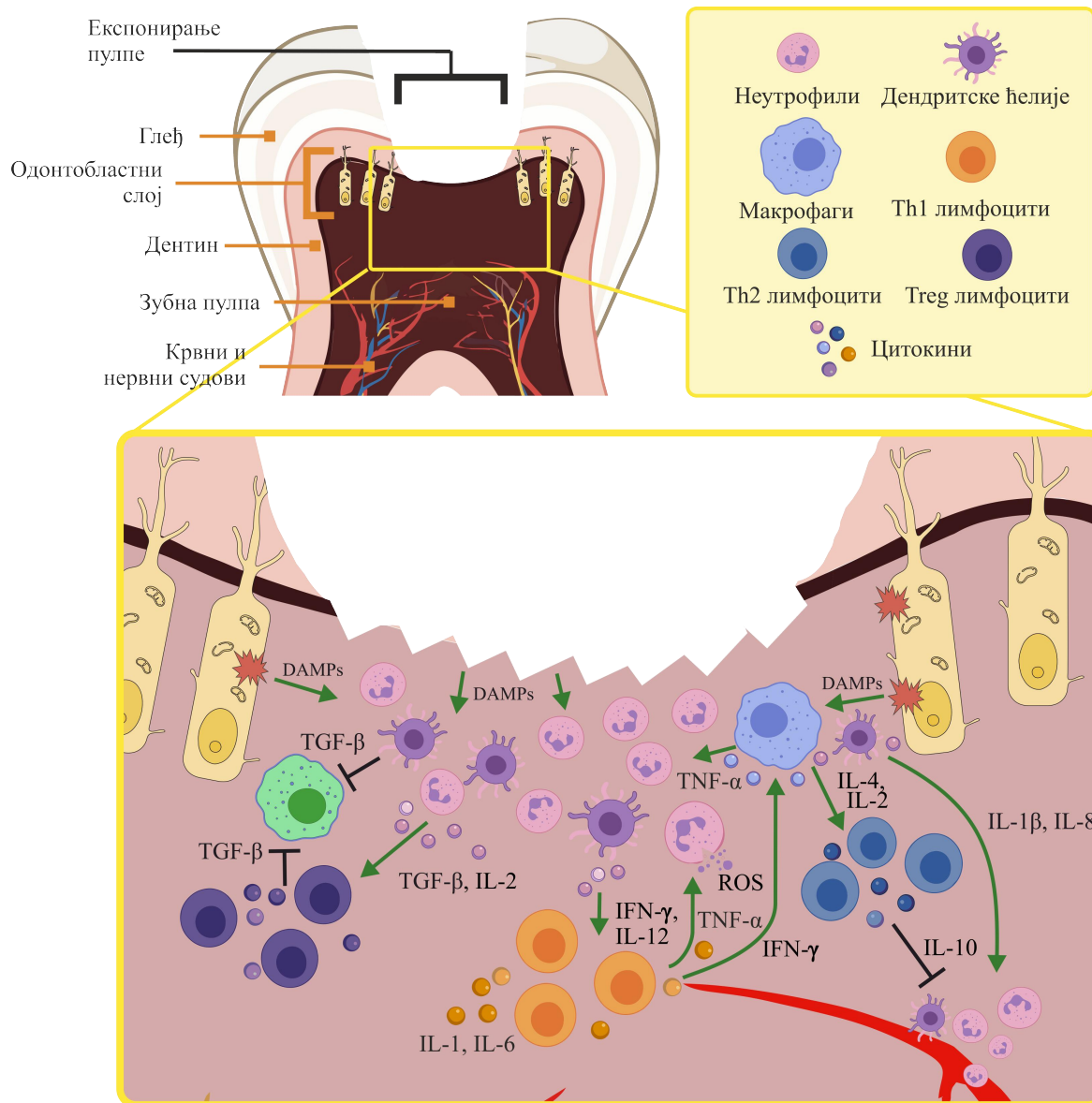
Уз формативну, зубна пулпа има и заштитну улогу. Дентин служи као физичка баријера која штити зубну пулпу од спољашњих надражаја. Као самоодбрамбени механизам, зубна пулпа је способна да повећа дебљину дентина стварањем **реактивног дентина** или да смањи његову пропустљивост таложењем минерала у дентинским тубулима у процесу који се назива **склероза дентина**. У случају потпуног оштећења примарних одонтобласта и/или дентина, зубна пулпа је способна да формира нови слој минерализованог ткива названог **репаративни дентин** (14).

1.2 РЕАКЦИЈА ПУЛПЕ НА ЕКСПОНИРАЊЕ

Одонтобласти, као најпериферније ћелије зубне пулпе, представљају примарну мету за механичке, хемијске или бактеријске надражаје. Резултати истраживања показују да одонтобласти у реакцији са бактеријским продуктима експримирају рецепторе за препознавање патогена (енг. *pattern recognition receptors*, PRR),

првенствено TLR 2, 3, 5 и 9, чија активација има за последицу продукцију антимикробног пептида (β -дефензине) као и хемотактичких молекула (33). Експонирањем пулпе одонтобласни слој често бива уништен, због чега изостаје примарна локална имунолошка одбрамбена реакција, са истовременим активирањем акутног запаљенског процеса у пулпи насталог услед одумирања одонтобласти. (34).

Нарушавањем структуре одонтобласти долази до ослобађања молекула познатих као молекуларни обрасци повезани са оштећењем (енг. *damage-associated molecular patterns*, DAMP) који бивају препознати од стране макрофага и дендритских ћелија, али и других ћелија пулпе (34). Оштећене ћелије пулпе продукују бројне интерлеукине (енг. *interleukin*, IL), а међу најраније продукованим је IL-8, чија је главна улога регрутовање и хемотакса неутрофила (35). Неутрофили су први привучени у оштећено пулпно ткиво и учествују у одбрани пулпе од уплива микроорганизама. За њима на место оштећења долазе моноцити који диферентују у ткивне макрофаге. Локално диференцирани макрофаги фагоцитишу патогене и активирају Т лимфоците, укључујући стечени имунски одговор у запаљенски процес. Активирани макрофаги продукују бројне факторе запаљења међу којима су најчешћи фактор некрозе тумора – α (енг. *tumor necrosis factor - α* , TNF- α), IL-1, IL-12, али и TGF- β и IL-10 (36). Пулпно ткиво садржи и велики број незрелих дендритских ћелија, а њихов број се повећава и фенотип мења са напредовањем инфламацијског процеса. Дендритске ћелије активираним антигенима сазревају и презентују антигене наивним Т помоћничким лимфоцитима (енг. *T helper*, Th). У зависности од цитокинског миљеа, наивне Th0 ћелије могу диферентовати у правцу ефекторских Th1, Th2, Th17 или регулаторних (Treg) ћелија: Th1 ћелије диферентују у присуству IL-12 и интерферона - γ (енг. *interferon - γ* , IFN- γ); Th2 ћелије у присуству IL-4 и IL-2; Th17 ћелије у присуству TGF- β и IL-6; Treg ћелије у присуству TGF- β и IL-2 (1). В лимфоцити налазе се у малом броју у почетним фазама запаљења пулпе, међутим, њихов број се повећава у фазама иреверзибилног пулпитиса са повећањем Th лимфоцита (36) Пропагацијом запаљенског процеса у пулпи, секрецијом проинфламаторних цитокина, ћелије стечене имуности повратно делују на већ активираним ћелијама урођене имуности. Њихов утицај првенствено мења фенотип неутрофила и макрофага (M1 или M2), који поред тога што уклањају микроорганизме и друге продукте запаљења, могу да доведу и до иреверзибилних оштећења. (Фигура 2.).



Фигура 2. Схематски приказ реакције зубне пулпе након експонирања. Повреда ткива изазвана експонирањем и евентуални патогени чиниоци узрокују запаљенски одговор зубне пулпе. Оштећени слој одонтобласта и друге ћелије повређеног пулпног ткива производе молекуларне обрасце (DAMPs) које препознају фагоцитне и антиген презентујуће ћелије урођене имуности. Овако стимулисане, луче хемокине који спроводе регрутовање и хемотаксу неутрофила и макрофага, али и цитокине активирајући ћелије стечене имуности; Ћелије стечене имуности, зависно од врсте, делују мењајући фенотип ћелија урођене имуности, првенствено неутрофила и макрофага (M1 (означен плаво) или M2 (означен зелено)) остварујући проинфламаторни или имунорегулаторни ефекат; Зелена стрелица – стимулаторни ефекат; Црна стрелица – инхибирајући ефекат.

Показано је да неутрофили током фагоцитозе ослобађају MMP, реактивне кисеоничне врсте (енг. *reactive oxygen species*, ROS) и реактивне азотне врсте (енг. *reactive nitrogen species*, RNS) (37). Различите MMP имају сличне или супротне ефекте у пулпном ткиву током запаљенских и репаративних процеса: MMP-3 има имунорегулаторни ефекат смањујући број макрофага и антиген презентујућих ћелија у запаљењу, док MMP-9, коју највише секретују неутрофили, доводи до разарања колагена екстрацелуларног матрикса и сматра се важним показатељем деструкције пулпног ткива (35,38). Стварање реактивних кисеоничних и азотних врста је саставни део ћелијског метаболизма, међутим уколико су, услед недовољне активности

антиоксидацијских система, присутне у високим концентрацијама, изазивају оксидативни стрес и могу бити медијатор оштећења ћелијске структуре, липида, протеина и др. (39). Најзначајнији представник RNS је азот моноксид (NO^\cdot), а у ROS се између осталих сврставају супероксид анијон радикал (O_2^\cdot) и водоник пероксид (H_2O_2).

1.3 ДИРЕКТНО ПРЕКРИВАЊЕ ПУЛПЕ

Директно прекривање пулпе је препоручена процедура за терапију експониране виталне зубне пулпе, која подразумева постављање стоматолошког материјала на место експонирања како би се подстакло формирање заштитне баријере и одржао виталитет (40). На месту експонирања пулпе, слој одонтобласта је уништен због чега је потребно да постављени материјал стимулише њихову замену диферентованим ћелијама сличним одонтобластима како би формирали минерализовану баријеру названу „**дентински мост**“ (41–43). Такође, биокомпатибилни и биоактивни материјали који се користе у директном прекривању пулпе треба да умање интензитет запаљења пулпног ткива и убрзају његов опоравак (40,44). За директно прекривање зубне пулпе најчешће се користе препарати на бази калцијум хидроксида ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) и минерал триоксид агрегата (МТА) (45).

1.3.1 Индикације за директно прекривање пулпе

Када се планира директно прекривање, најважнија је процена клиничког стања зубне пулпе. На основу клиничких симптома, стање зубне пулпе може се класификовати у неколико категорија: здрава пулпа – зуб не показује никакве симптоме који би указали на патолошко стање, а на тестове виталитета реагује уобичајено; реверзибилно запаљена пулпа – јавља се оштар кратак бол на термичке сензације, а на тестове виталитета реагује уобичајено; иреверзибилно запаљена пулпа – постоје спонтани болови различитог карактера и измењена је реакција зубне пулпе на тестове виталитета (46). Следећи фактор који се узима у обзир је стање апексног периодонцијума на основу перкусије и палпације, али и радиолошке анализе (40). Такође, да ли се експонирање догодило кроз здрав или каријесно измењен дентин важан је фактор који се разматра у планирању терапије (40). Величина места експонирања дуго је сматрана важним фактором за успех директног прекривања пулпе из два разлога; у случајевима већих дефеката, теже је успоставити хемостазу, а ако је притом експонирање учињено кроз каријесни дентин, повећава се ризик од бактеријске контаминације (47). Међутим, Европско ендодонтолошко друштво (енг. *European Society of Endodontology*) искључује величину експонирања као значајан фактор, те је терапију директним прекривањем пулпе класификовало на основу индикација у две категорије (2):

- класа I - преоперативно није потврђено присуство каријесне лезије. Клинички је процењено да се експонирање пулпе догодило кроз здрав дентин уз очекивање да је и зубна пулпа здрава (експонирање пулпе узроковано траумом зуба или јатрогено);

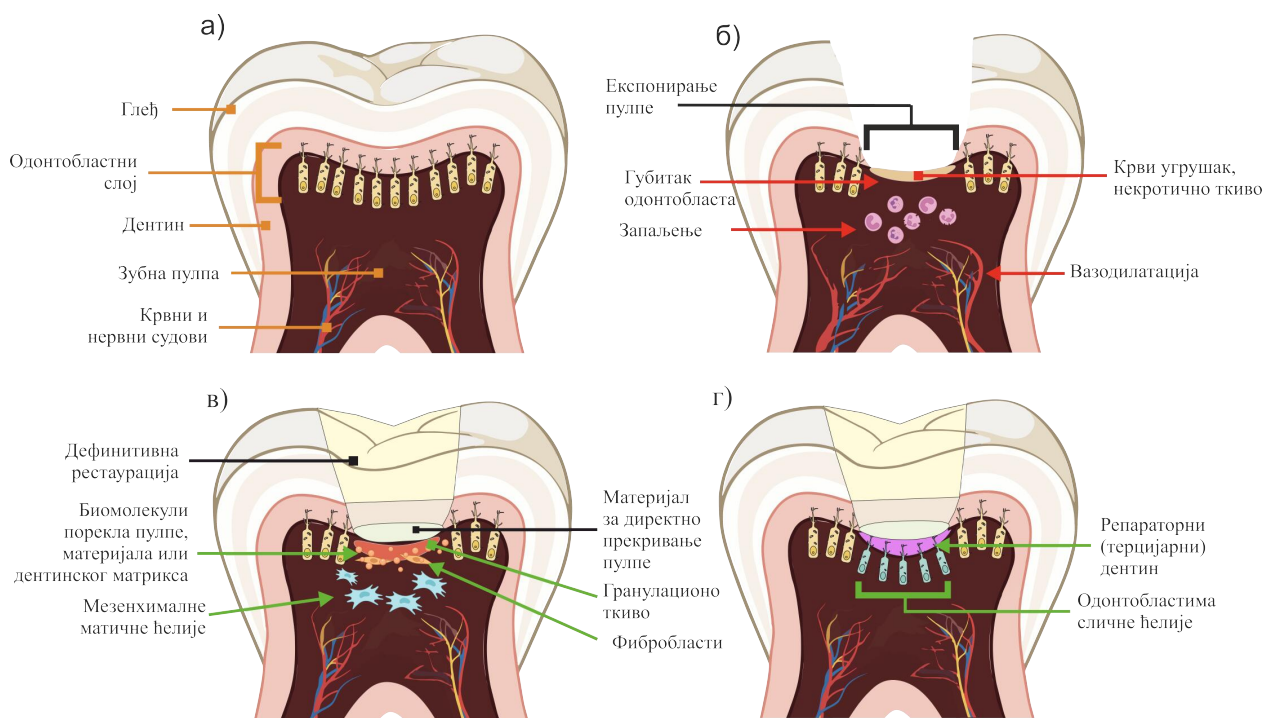
- класа II – преоперативно присуство дубоке каријесне лезије. Клинички је процењено да се експонирање пулпе догодило кроз зону бактеријске контаминације уз очекивање да је зубна пулпа здрава или у стању реверзибилног запаљења (каријесно експонирана пулпа).

1.3.2 Зарастање пулпне ране након директног прекривања

Запаљење настало експонирањем или дејством материјала сматра се основом за отпочињање репаративних процеса на којима се заснива терапијски ефекат директног прекривања пулпе (48,49). Показано је да препарати калцијум хидроксида свој ефекат остварују изазивањем стерилне површинске некрозе на месту апликовања. Ово хемијско оштећење стимулише благу запаљенску реакцију и миграцију васкуларних ћелија и ћелија запаљења, али и недиферентованих мезенхимских ћелија да диферентују у ћелије сличне одонтобластима (48). Као и у другим везивним ткивима, одговор на прекид интегритета пулпе представља инфламаторна реакција која обухвата (32):

- 1) Хемостазу и формирање крвног угрушка;
- 2) Запаљенски одговор ткива;
- 3) Пролиферацију ћелија и миграцију;
- 4) Ремоделацију ткива.

Mjor и *sap.* (50) детаљно су на основу хистолошке анализе описали зарастање ране након директног прекривања калцијум хидроксидам на следећи начин: ткиво на месту постављања материјала прекривено је некротичним дебрисом, крвним угрушком и инфилтратом неутрофила (**Фигура 3.б**). Запаљенски инфилтрат бива замењен гранулационим ткивом, након 3 – 6 дана и садржи бројне фибробласте и новоформиране крвне судове (**Фигура 3.в**). Фибробласти синтетишу елементе екстрацелуларног матрикса у који мигрирају недиферентоване мезенхималне матичне ћелије. Ове ћелије се око 11. дана уочавају као кубоидне ћелије од којих поједине попримају облик сличан одонтобластима (**Фигура 3.в**). Кубоидне ћелије се реорганизују и палисадно распоређују карактеристично за одонтобласте 14 дана од директног прекривања, а изнад њих се уочава структура слична дентинском матриксу (50). Око месец дана након директног прекривања уочава се формирани дентински мост на месту експонирања зубне пулпе (32) што је схематски приказано на **Фигури 3.г**.



Фигура 3. Схематски приказ реакције зарастања пулпне ране након експонирања. а) Интактан зуб карактерише се непрекинутим одонтбластним слојем на периферији зубне пулпе испод слоја интактног дентина; б) Услед прекидања слоја глеђи и дентина и експозиције пулпе нарушен је и одонтбластни слој. На површини пулпне ране долази до формирања крвног угушка са слојем повређеног некротичног ткива. Ово изазива запаљенску реакцију која је у почетним фазама реверзибилног карактера; в) Постављени биокомпатибилни материјал на површини пулпне ране делује стимулативно на репараторне и регенеративне процесе посредством биомолекула порекла самог материјала, ћелија зубне пулпе или дентинског матрикса. Биомолекули стимулишу миграцију недиферентованих матичних ћелија из унутрашњих слојева зубне пулпе; г) Матичне ћелије диферентују у ћелије сличне одонтбластима (секундарне одонтбласте) који луче слој репараторног дентина (дентински мост).

1.3.2.1 Молекуларни чиниоци зарастања пулпне ране

Интерлеукин 1 (IL-1) – представља породицу цитокина чија је основна функција контрола инфламаторних реакција у одговору на повреду ткива (51). До сада је потврђено постојање 11 чланова породице IL-1 (52). Присуство IL-1 α , а посебно IL-1 β , потврђено је у здравој и инфламираној зубној пулпи након експонирања и директног прекривања (1,53,54). У запаљенским процесима, мастоцити, макрофаги и неутрофили продукују IL-1 α у пуној биоактивној форми и IL-1 β у неактивној форми. За активацију IL-1 β потребно је формирање инфламозома и активација каспазе-1 (52). Показано је да уништени слој одонтбласта, највероватније путем DAMPs молекула, може да узрокује активацију инфламозома и каспазе-1 и последично формира активне облике IL-1 β (34). У акутном запаљењу IL-1 β стимулише синтезу IL-8 и у садејству са њим, учествује у стимулацији миграције неутрофила на место повреде ткива (51,53). Иако је познато његово проинфламаторно дејство у многим ткивима, сматра се да може остваривати и репараторне ефекте, стимулишући фибробласте на синтезу колагена (55). Такође, *in vitro* је показано да IL-1 β стимулише матичне ћелије костне сржи усмеравајући их ка фенотипу ћелија које имају минерализујућа својства, док је у ћелијама периодонталног лигамента стимулисао минерализацију у малим дозама, а инхибирао у високим (34). Сматра се, да мале количине IL-1 β у експонираном пулпном ткиву могу да стимулишу репарацију кроз диференцијацију ћелија пулпе у ћелије сличне одонтбластима (34,56).

Фактор некрозе тумора α (TNF- α) – је молекул који остварује различите функције укључујући повећање токсичности леукоцита, стимулацију протеина акутне фазе запаљења и промовисање продукције инфламаторних цитокина. Највише га продукују макрофаги као одговор на стимулацију TLR, али и у одговору на отпуштање протеина из екстрацелуларног дентинског матрикса током деминерализације (35,37). Осим макрофага, TNF- α могу да продукују и активирани Th1 лимфоцити (1). TNF- α је један од кључних проинфламаторних цитокина и заједно са IL-1 β , стимулише продукцију хемотактичног IL-8. Такође, TNF- α подстиче неутрофилну дегранулацију и отпуштање ROS (35). Показано је да TNF- α може да промовише репаративне процесе када је присутан у мањим концентрацијама (57). Један од механизма којима TNF- α укључен у репаративне процесе је активација сигналног пута митогеном-активирани протеин киназе p38 који индукује диференцијацију DPSC у ћелије сличне одонтобластима што се региструје порастом DSPP. Међутим, у великим концентрацијама, TNF- α смањује активности алкалне фосфатазе (енг. *alkaline phosphatase*, ALP), OPN и OCN, чиме има супримирајући ефекат на стварање репаративног дентина (35).

Интерферон γ (IFN- γ) – продукују активирани CD4 и CD8 Т лимфоцити, NK (енг. *natural killer*) ћелије, В лимфоцити, моноцити, макрофаги и дендритске ћелије (58). Његова основна улога је стимулација ћелија која врше фагоцитозу, првенствено макрофага, и повећање експресије рецептора главних хистокомпатибилних комплекса на површини антиген презентујућих ћелија (36,58,59). Сматра се да је пораст експресије IFN- γ у пулпном ткиву показатељ интензивног проинфламаторног имунског одговора (36). Насупрот, показано је да IFN- γ стимулише остеогену диференцијацију мезенхималних матичних ћелија чиме учествује и у репаративним процесима (60). Такође, IFN- γ побољшава дентиногена својства DPSC појачаном експресијом ALP, OCN и DSPP у *in vitro* условима. *In vivo*, трансплантиране DPSC, претходно третиране са IFN- γ , развиле су структуре сличне пулпо-дентинском комплексу (61).

Интерлеукин 6 (IL-6) – је плеоморфни цитокин укључен у процесе одговора ткива на трауму или инфекцију. Производе га многе ћелије укључујући макрофаге, неутрофиле, кератиноците, фибробласте и ендотелне ћелије (62). IL-6 се сматра и проинфламаторним и имунорегулаторним цитокином (63,64). Показано је да је експресија IL-6 значајно већа у инфламираној него у здравој зубној пулпи, а присуство овог цитокина се повезује и са настанком едема у пулпи захваћеној инфламацијом (65,66). Осим претходно наведених улога IL-6 може и да стимулише продукцију антитела, активацију Т лимфоцита, диференцијацију В лимфоцита, синтезу протеина акутне фазе, хематопоезу, ангиогенезу и диференцијацију остеокласта (62). Његова имунорегулаторна функција огледа се у инхибицији продукције проинфламаторних цитокина као што су TNF- α и IL-1 (63,67).

Интерлеукин 8 (IL-8) – представља један од главних хемокина који регрутује неутрофиле на место повреде експонираног пулпног ткива (53). Њега синтетишу макрофаги, ендотелне ћелије и фибробласти под утицајем бактеријских продуката или дејства цитокина као што су IL-1 β и TNF- α (37,62). Главна улога IL-8 је стимулација хемотаксе неутрофила те је, заједно са IL-1 β , најзаступљенији цитокин у акутним фазама запаљења пулпе (35). Експресија IL-8 показана је и у фибробластима, остеобластима и одонтобластима (68). Овај цитокин сматра се проангиогеним фактором због чега му се приписује и улога у зарастању пулпне ране у директном прекривању (69). Интересантан је податак да IL-8 није присутан ни у једном ткиву

пацова, али је детектован њему хомологни протеин познат као онкоген регулисан растом (енг. *growth-regulated oncogene*, GRO).

Интерлеукин 10 (IL-10) – је имунорегулаторни цитокин који продукују многе имунске и неимунске ћелије како би ограничиле запаљење. Његово присуство детектовано је у узорцима хумане иреверзибилно инфламиране пулпе, али не и у здравој пулпи (70). IL-10 највише продукују активирани макрофаги (M2) и Th2 лимфоцити у одговору на присуство проинфламаторних цитокина TNF- α и IL-1 β (36). Осим тога, експериментално (*in vitro*) је показано да IL-10 продукују и ћелије сличне одонтобластима након активације TLR на својим површинама (65). IL-10 остварује своја имунорегулаторна дејства првенствено смањењем продукције проинфламаторних цитокина (IL-6, IL-8, IFN- γ) што доводи до ограничавања запаљенског процеса и смањења фагоцитозе и матурације дендритских ћелија (36,57). Међутим, IL-10 се сматра и инхибитором зрастања, обзиром да инхибира и активности фибробласта (71,72).

Трансформишући фактор раста β (TGF- β) – у својим изоформама (TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3) присутан је у запаљенским и репараторним процесима у експонираној и директно прекривеној пулпи (73). TGF- β на ћелијском нивоу регулише пролиферацију, миграцију, диференцијацију и апоптозу, а поседује и имуномодулаторна својства што се првенствено огледа у његовим имунорегулаторним ефектима (74). У експонираном пулпном ткиву највише га продукују макрофаги и ендотелијалне ћелије, као и одонтобласти (67,75). TGF- β утиче на поларизацију стеченог имунског одговора тако што, промовише диференцијацију Т регулаторних ћелија и истовремено инхибише пролиферацију и функцију ефекторских Th1 лимфоцита и антиген презентујућих ћелија. Такође, стимулирани високим концентрацијама TGF- β у ткивима, макрофаги попримају имуносупресивни фенотип (M2 макрофаги) (76). С друге стране, TGF- β је познати фактор промоције одонтогенезе присутан још у различитим фазама развоја пулпо-дентинског комплекса (12–14). У фазама развоја, одонтобласти секретују TGF- β , који остаје секвестриран у дентину као најприсутнији цитокински неколагени елемент дентинског матрикса (44,77). Секвестрирани протеини дентинског матрикса могу бити отпуштени у пулпно ткиво дејством деминерализујућих својстава каријесне лезије, повреде дентина или дејства материјала за директно прекривање (77). У репаративној дентиногенези, услед експонирања пулпе, TGF- β промовише формирање дентинског матрикса кроз стимулацију диференцијације DPSC у ћелије сличне одонтобластима (57,74,75).

Алкална фосфатаза (ALP) – Алкална фосфатаза је нашироко распрострањена у различитим ткивима укључујући и зубну пулпу (78). У човека, ALP је класификована у три типа: универзални (ALP бубрега, јетре и костију), интестинални и плацентални тип (79). У зубној пулпи, највеће присуство ALP показано је у одонтобластном и субодонтобластном слоју, а фибробласти и одонтобласти могу да синтетишу и отпуштају ALP (80). Велика активност ALP у субодонтобластном слоју индикативна је за диференцијацију ових ћелија у ћелије сличне одонтобластима (81). *Ex vivo* анализом хумане зубне пулпе, показано је далеко веће присуство активност ALP у реверзибилно запаљеној зубној пулпи у односу на здраву и иреверзибилно запаљену (82). Активност ALP у културама DPSC и других ћелија порекла зубне пулпе користи у многим истраживањима као показатељ одонтобластне активности и способности за минерализацију у тим културама (83). Експериментално (*in vivo*) је показано да високе

концентрације проинфламаторних цитокина TNF- α , IL-1 β и IFN- γ умањују активност ALP и синтезу колагеног матрикса у културама (48,84).

Остеокалцин (OCN) – Остеокалцин продукују остеобласти и одонтобласти у фазама минерализације и представља маркер вибилности, диференцијације и остео/одонтогеног потенцијала ових ћелија (85). Улази у састав неколагеног дела дентинског матрикса и сматра се репаративним молекулом чија се експресија повећава у случајевима повреде зубне пулпе (86). Сматра се завршним показатељем диференцијације одонтобласта, како је његова експресија највећа у зрелим одонтобластима (87). Анализом хумане зубне пулпе (*ex vivo*) показано је присуство OCN у запаљеној зубној пулпи, са значајно већом експресијом у реверзибилно него у ирреверзибилно запаљеној пулпи, док здрава пулпа није показала експресију OCN (86,88). Извор OCN у запаљењу зубне пулпе, осим одонтобласта, су и макрофаги, за које је показано да експримирају OCN при трансдиференцијацији у остеобласте, што може да објасни повећану експресију у запаљењу пулпе (89). За смањену експресију у ирреверзибилном пулпитису сматрају се одговорни проинфламаторни цитокини, IL-1 и IL-8, чија је експресија показала негативну корелацију са експресијом OCN (88).

Дентин сијалофосфопротеин (DSPP) – Ген *DSPP*, дуго сматран дентин специфичним геном, одговоран је за кодирање дентин сијалофосфопротеина (DSPP), а његовим цепањем добијају се још два протеина, дентин сијалопротеин (енг. *dentine sialoprotein*, DSP) и дентин фосфопротеин (енг. *dentine phosphoprotein*, DPP). Сва три протеина, чиниоци су неколагене компоненте дентинског матрикса у који бивају секвестрирани у формативним фазама пулпо-дентинског комплекса (90,91). Иако се сматрало да је *DSPP* дентин специфичан ген, његово присуство показано је и у костима, цементу и појединим неминерализованим ткивима. Мутације овог гена повезане су са поремећајима минерализације дентина, *dentinogenesis imperfecta* и дисплазијом дентина (92,93). *DSPP* је експримиран у одонтобластима, дентину и у ћелијама сличним одонтобластима испод слоја репаративног дентина (44). DSP остварује ефекте у почетним фазама стварања дентина делујући на раст, миграцију и диференцијацију пулпних ћелија у одонтобласте, док DPP стимулише минерализацију везујући се за колаген и иницирајући раст и минерализацију кристала хидроксиапатита (44,91).

Протеин дентинског матрикса 1 (DMP-1) – У зубним ткивима, DMP-1 је експримиран у пулпним ћелијама, одонтобластима, у предентину и дентину где је најчешће секвестриран у перитубуларном региону заједно са DSP и у цементу. Учествује у функцијама одонтобласта у развоју пулпо-дентинског комплекса, али и у контроли дентиногенезе (94). Показано је да аблација *Dmp1* гена у мишијем моделу доводи до појаве дефеката у минерализацији дентина, указујући на значај DMP у диференцијацији одонтобласта, формирању тубуларног дентина и његовој минерализацији (95). У *in vitro* условима, показано је да DMP-1 стимулише диференцијацију пулпних ћелија у ћелије сличне одонтобластима (96). Такође, DMP-1 учествује у запаљенским процесима пулпе, о чему сведочи његова повећана експресија у инфламираном пулпном ткиву, а показан је и утицај DMP-1 на културу фибробласта зубне пулпе у којој је повећао експресију проинфламаторних цитокина IL-6 и IL-8 (97).

Реактивне кисеоничне врсте (ROS) – ROS представља заједнички термин за хемијска једињења настала некомплетном редукцијом кисеоника у које су убрајају супероксид анјон радикал (O_2^-), водоник пероксид (H_2O_2), хидроксилни јони (OH^-) и др (98). Зависно од присуства ROS у ћелијама ткива, они могу остваривати двојаку функцију. У

случају умереног формирања, ROS остварују улоге сигналних молекула у физиолошким условима спроводећи низ ефеката које за циљ имају успостављање иницијалног инфламаторног одговара, ћелијску диференцијацију и стварања услова за репарацију ткива (99). Међутим, у случајевима повећане продукције долази до настанка оксидативног стреса у коме ROS узрокују оштећење ћелија изазивајући апоптозу, аутофагију и некрозу (98). Према резултатима претходних *in vitro* студија ROS, од којих је најбоље истражен H_2O_2 , остварују цитотоксично дејство на DPSC, смањујући њихову вијабилности и одонтогени потенцијал (100–102). Супротно њима, *Benetti* и сар. (103) су показали да излагање пулног ткива H_2O_2 доводи до иницијалног поремећаја редокс механизма, међутим, изазвани оксидативни стрес је довео до повећања одонтогеног потенцијала ћелија пулпе изражен кроз пораст експресије остеопонтина и OCN. Слично је показано и на култури одонтобласта, где је примена H_2O_2 изазвала повећано формирање дентинског матрикса (104).

1.3.3 Материјали за директно прекривање пулпе

Прво записано спровођење директног преривања пулпе извео је 1756. године Филип Пфаф (*Philipp Pfaff*), постављајући златну фолију на експонирано пулно ткиво. Од тада, многи агенси за директно прекривање су предлагани укључујући каутеризацију, олово, растворе за дезинфекцију и есенцијална уља, различита средства на бази цинк оксида, све до представљања калцијум хидроксида, 1930. године, од стране Бернарда Хермана (*Bernhard Hermann*) (105). Калцијум хидроксид у облику праха, пасте и цемента дуго се користи због клиничког успеха и формирања репаративног дентина уз одржавање виталитета пулпе, индукције минерализације и антибактеријског ефекта. Половином 20. века постао је „златни стандард“ у терапији директним прекривањем пулпе све до развоја МТА 1990. године од стране Торабинежада и Вајта (*Torabinejad* и *White*) и почетка његове примене 2006. године (40).

Материјал који се користи у терапији директним прекривањем пулпе требало би да поседује добре физичке карактеристике и способност заптивања, да буде нетоксичан за пулно ткиво, антимицробан, да има брзо време везивања, лаку манипулативност и ниску цену, а уз то да стимулише и модулира процесе зарастања посредоване DPSC (106). Обзиром на високе захтеве које ова терапијска процедура поставља, сасвим идеалан материјал не постоји, ипак, директно прекривање пулпе деценијама се спроводи са високим клиничким успесима, а развојем нових материјала, успех постаје све предвидивији (45).

1.3.3.1 Калцијум хидроксид

Калцијум хидроксид ($Ca(OH)_2$) традиционално се сматрао „златним стандардом“ у директном прекривању пулпе првенствено због свог антимицробног дејства, промоције минерализације и стварања репаративног дентина. То је веома базно једињење ($pH \approx 12$) које у контакту са пулпним ткивом изазива површинску коагулациону некрозу. Испод зоне некрозе долази до благе инфламације која промовише диференцијацију и миграцију имунских али и ћелија сличних одонтобластима доводећи на крају до формирања дентинског моста (43).

Механизам дејства калцијум хидроксида заснива се на његовој дисоцијацији у ткивним течностима на хидроксилне (OH^-) и калцијумове јоне (Ca^{2+}) (107).

Захваљујући OH^- јонима који могу да оштете ћелијску мембрану и ДНК микроорганизама, калцијум хидроксид остварује антимикуробно дејство (43). Такође, отпуштање OH^- повећава рН вредност средине. Повећањем алкалности средине калцијум хидроксид утиче на повећање активности ALP и делује имунорегулаторно путем денатурације проинфламаторних цитокина IL-1 и TNF- α (108,109). Захваљујући Ca^{2+} јонима чија концентрација је значајно повећана у пулпном ткиву испод материјала, калцијум хидроксид може да стимулише миграцију и диференцијацију ћелија сличних одонтобластима (110). Такође, Ca^{2+} јони стимулишу продукцију BMP2 и остеооптина који потенцијално доприносе стварању дентинског моста (43). Показано је да калцијум хидроксид остварује и дејство на дентински матрикс, растварајући га и отпуштајући неколагене компоненте (најзначајније TGF- β 1) које додатно стимулишу DPSC и друге пулпне ћелије у репаративним процесима (111).

Иако је показао значајан успех у директном прекривању пулпе, калцијум хидроксид има одређене недостатке. Препарати у облику цемента веома су растворљиви и долази до њиховог потпуног растварања остављајући празан простор испод дефинитивне рестаурације (107). Додатно, калцијум хидроксид има недовољна физичка својства, не поседује својства адхезије за зубна ткива и обезбеђује недовољно заптивање (112). Такође, иако је показана висока стопа успешност формирања дентинског моста показана по неким ауторима (113), око 90% формираних мостова испод калцијум хидроксида показује зоне неминерализованог дентина тзв. „**тунел дефекте**“ који могу престављати пут ширења микроорганизама и настанка запаљења пулпе (114).

1.3.3.2 Калцијум силикатни цементи

Минерал триоксид агрегат (МТА) као главни представник групе калцијум силикатних цемената, уведен је у стоматолошку клиничку праксу првенствено као материјал за ретроградну оптурацију корена зуба, а велику популарност је стекао највише због слабе растворљивости у присуству течности. МТА је по саставу мешавина основних делова Портланд цемента, дикалцијум силиката и трикалцијум силиката, трикалцијум алумината и тетракалцијум алуминоферита са бизмут оксидом. Садржи и силицијум диоксид, калцијум оксид, магнезијум оксид и калијум сулфат у траговима (43). МТА је хидрофилни цемент, а реакција његовог везивања дешава се у води те га од многих стоматолошких материјала разликује понашање у влажној средини (115). Данас је МТА један од највише коришћених калцијум силикатних цемената, а резултати прегледних чланака и мета-анализа показују веће успехе МТА у директном прекривању пулпе у односу на калцијум хидроксид (113,116,117).

Постављање МТА у контакт са ткивним течностима доводи до хидратације цемента, стварања калцијум силикат хидрата и отпуштања калцијум хидроксида. Калцијум хидроксид даље дисосује на OH^- и Ca^{2+} јоне, а Ca^{2+} јони, уз јоне силицијума, додатно се отпуштају из хидрогела калцијум силиката (118). Додатан извор јона, највише Ca^{2+} и фосфора, представља структура слична апатиту коју формира у контакту МТА са ткивима. Јонска размена са ткивом зубне пулпе чини МТА биоактивним материјалом који делује антимикуробно, регулише продукцију проинфламаторних цитокина и стимулише диференцијацију и активност ћелија сличних одонтобластима (119). Иако није показано да МТА као калцијум хидроксид изазива површинску некрозу, познато је да високим рН и отпуштањем јона може да стимулише отпуштање цитокина IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, и IL-8 чиме изазива благу и

акутну инфламацију која погодује започињању репаративних процеса у пулпи (1). МТА такође, поседује потенцијал да повећа експресију фактора раста стимулацијом отпуштања TGF- β 1 секвестрираног у дентинском матриксу или производње VEGF од стране ћелија пулпе (120–122). МТА промовише и активност секреције дентина изражену кроз повећање експресија маркера одонтобластне активности ALP, DSPP, DMP-1 и OCN (121,122).

МТА се сматра супериорнијим у односу на калцијум хидроксид због способности да створи дебљи уједначени слој репаративног дентина са мало тунел дефеката, слабијег запаљенског одговора и изостанка некрозе пулног ткива (123). Такође, МТА показује бољу способност заптивања, већу физичку отпорност и стабилност, а мању растворљивост (124). Међутим, МТА има и неколико недостатака: дуго време везивања материјала, отежана манипулација, дисколорација зуба и висока рН вредност при везивању (40,124).

Како би се превазишли недостаци, током година мењана је оригинална формула МТА што је довело до настанка модификованих МТА и МТА-сличних материјала. Биодентин (Septodont, Lancaster, PA, USA) је двокомпонентни калцијум силикатни цемент сличан МТА који се састоји трикалцијум силикат, калцијум карбонат, калцијум оксид и цирконијум оксид у праху и течне компоненте која представља водени раствор хидросолубилног полимера, воде и калцијум хлорида. Калцијум хлорид убрзава реакцију хидратације, а полимер смањује количину воде потребне за мешање обезбеђујући одговарајућу конзистенцију, што доприноси лакој руковању смешом (115).

Показано је да су ефекти биодентина слични ефектима МТА. Упоређивањем цитотоксичности МТА и биодентина у *in vitro* условима, показано је да не постоји разлика у цитотоксичности ова два материјала, али да оба имају значајно мањи цитотоксичан ефекат у односу на глас јономер цемента (125). Такође је утврђено да Биодентин не поседује цитотоксичан и генотоксичан ефекат на хумане фибробласте пулпе (126). Способност отпуштања јона Ca^{2+} и силицијума из Биодентина и њихова уградња у околни дентин једнака је као код МТА (127). *In vitro* испитивања на ћелијама пулпе глодара, показала су да Биодентин узрокује пролиферацију ћелија уз пораст маркера одонтобластне активности OCN (128). Биодентин показује једнак утицај на повећање експресије TGF- β 1 као МТА (129), међутим, на продукцију цитокина показује различит утицај. Биодентин узроковао је повећану експресију проинфламаторних IL-18 и IFN- γ , а смањену експресију IL-6 у односу на МТА (60). Резултати рандомизованих клиничких студија и њихова мета-анализа указују на једнаку успешност биодентина са МТА у смањењу запаљења, формирању дентинског моста и очувању виталитета зубне пулпе, међутим, број клиничких студија и даље је недовољан да би се јасно показао дуготрајни ефекат биодентина у директном прекривању пулпе (113).

1.3.4 Успешност директног прекривања

Успех директног прекривања пулпе заснива се на постизању неколико клиничких и радиографских критеријума током одређеног временског периода. Критеријуми укључују: одржан виталитет и минимални запаљенски одговор зубне пулпе, стварање континуираног слоја репаративног дентина, непостојање клиничких знакова и симптома термичке и/или перкуторне осетљивости, бола, отока, непостојање

радиографских знакова ресорпција корена, периапикалне или интра-радиксне ресорпције и калцификација, као и завршетак раста корена и апексогенеза у случају младих зуба (130).

Стопа успеха директног прекривања пулпе различита је у зависности од типа експонирања пулпе, коришћеног материјала и периода праћења успеха (3). Показан је успех 80 – 100% коришћењем МТА у директном прекривању пулпе током периода од 30 до 1140 дана, док је калцијум хидроксид показао успех у 70 – 96% у истом временском периоду (113). *Mente* и сар. (4) посматрали су стопу успеха МТА и калцијум хидроксида у временском периоду од 3 до 10 година и показали да је директно прекривање пулпе МТА остварило просечан успех у 80% случајева, док је калцијум хидроксид био успешан у 59%. Успех калцијум хидроксида додатно је био компромитован у случајевима експонирања пулпе кроз каријесно измењени дентин (57% успеха у експонирању кроз каријесно измењен насупрот 70% успеха у експонирању кроз здрав дентин) (4). *Cushley* и сар. (131) анализирали су претходне студије директног прекривања каријесно експониране пулпе и показали да су калцијум хидроксид, МТА и биодентин успешни у 74%, 91% и 96% након шест месеци, а да успешност опада временом износећи 59%, 84% и 86% након три године.

Треба имати у виду да је у клиничкој пракси већина виталних експозиција пулпе последица каријеса. Каријесне експозиције често прати бактеријска контаминација пулпног ткива, као и запаљенска реакција. У таквим случајевима, тачна дијагноза стадијума запаљења пулпе директно утиче на прогнозу директног прекривања пулпе (116). Додатно, имајући у виду да материјали за директно прекривање узрокују запаљенску реакцију, успех терапије биће компромитован ако се поставе на пулпу са већ постојећим запаљењем (5). Из тих разлога, спроведена су бројна истраживања утицаја других једињења, медикамената и фактора раста појединачно или у комбинацији са постојећим препаратима на инфламацију и репаративну дентиногенезу у директном прекривању пулпе, а са циљем да замене и побољшају карактеристике потенцијално каустичних калцијум хидроксида и МТА. До данас, *in vivo* су испитивана дејства биомолекула у моделима директног прекривања пулпе укључујући: факторе раста: TGF- β (132–135), BMP (136–140), фактор раста сличан инсулину (енг. *insulin-like growth factor*, IGF) (135,141), FGF-2 (135,142), епидермални фактор раста (енг. *epidermal growth factor*, EGF) (135,143); молекуле дентинског матрикса: DMP-1 (96,144), DSPP (145,146); калцитонин (147,148); хормон раста (149); амелогенин (150,151); екстракт плаценте (121); екстракт алоје вере (152); прополис и његове деривате (153–155); синтетске кортикостероиде (5) и друге (74).

1.4 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛИ ДИРЕКТНОГ ПРЕКРИВАЊА

Како би се испитали ефекти материјала и боље разумели механизми инфламације и репарације у директном прекривању пулпе, користе се различити анимални модели укључујући оне на мајмунима (114,137,156,157), свињама (150,151,158), псима (133,145,146), фереткама (138,148) и пацовима (96,134–136,140–143,146,147). Хистолошка посматрања реакција директно прекривене пулпе пацова показала су процесе зарастања сличне хуманој пулпи чинећи анимални модел на пацовима погодним за ове врсте испитивања.

Мандибула и максила пацова садржи пар секутића и по три молара са обе стране вилица. Секутићи су функционално и морфолошки карактеристични за глодаре

(изражених сечивних ивица, отворених апекса и поседују способност континуираног ницања), док молари подсећају на хумане моларе како по анатоמו-морфолошким карактеристикама крунице и корена, тако и по грађи пулпо-дентинског комплекса (159). Након експонирања пулпе пацова, јавља се запаљенска реакција слична оној у хуманој пулпи, а у случају изостанка третмана, пулпа постаје инфламирана и инфицирана што води ка развоју периапикалних лезија као код људи (160). Након директног прекривања пулпе пацова, почетна инфламација пролази након једне недеље, након две недеље започиње синтеза репаративног дентина, а дентински мост у потпуности се формира након четири недеље (159).

Како би се симулирале две класе индикација за директно прекривање пулпе (трауматска експозиција, када се очекује да је пулпа здрава и каријесна експозиција, када се очекује да је пулпа у стању реверзibilног запаљења) у употреби су два модела експерименталних експонирања пулпе:

- Експонирање праћено истовременим директним прекривањем пулпе: представља најчешће коришћени експериментални модел који подразумева препарацију кавитета прве класе на првом максиларном или мандибуларном молару (поједини аутори препоручују препарацију кавитета пете класе на мезијалној површини), експонирање пулпе мањим сврдлом, ендодонтским инструментом или ендодонтском сондом, асепсу радног поља, хемостазу и постављање материјала за директно прекривање праћено дефинитивном рестаурацијом хибридном глас-јономер цементом и/или композитним материјалом (121,135,161,162).
- Експонирање и одложено директно прекривање пулпе: експериментални модел који се користи да симулира каријесно експонирану или инфламирану зубну пулпу. Како би се ово симулирало, експонирање се обавља на исти начин као у првом моделу, али оно није праћено директним прекривањем, већ се зубна пулпа оставља експонирана оралној средини наредних 48 часова. Након два дана, успостављају се асептични услови рада, а зубна пулпа се директно прекрива материјалом. Даље следи већ описана дефинитивна рестаурација (5,163,164). Други начин да се индукује реверзibilно запаљење је да се након експонирања примени липополисахарид (енг. *lipopolysaccharide*, LPS), а затим постави материјал за директно прекривање и испун (165).

Као материјали за директно прекривање пулпе у досадашњим истраживањима коришћене су различите формулације калцијум хидроксида, МТА, других калцијум силикатних цемената, али и велики број фактора раста и биомолекула. За њихово допремање и задржавање на месту експонирања пулпе, али и контролисано отпуштање, коришћени су бројни природни и синтетски носачи у досадашњим истраживањима (74).

- Колаген је најважнији састојак екстрацелуларног матрикса везивних ткива. Међу природним полимерима, говеђи колаген, примарно тип I, дуго се употребљава у биомедицинске сврхе као хемостатички производ у циљу лечења оштећења ткива. Колаген је често коришћен материјал као носач за директно прекривање пулпе факторима раста и другим биомолекулима у течном стању. Лако се ресорбује у телу и има веома малу антигеност. Осим трога није токсичан, биоразградив је и биокompatibilан, има велику отпорност на истезање и висок апсорптивни капацитет (166). Коришћен је у облику мембране

(135), праха (137,138), сунђера (142) или матрикса заједно са коштаним заменицима (144). *Hu* и *cap.* (135,143) користили су говеђу колагену мембрану исечену на коцке 1mm^3 које су биле способне да апсорбују $5\mu\text{l}$ раствора са факторима раста, а које су потом постављали као медикамент за директно прекривање пулпе пацова.

- Хитосан је дериват природног полисахарида хитина, полимера присутног у егзоскелету инсеката, љускара, али као чинилац ћелијског зида гљивица. Хитосан има одличну биокомпатибилност, високу биолошку активност, биоразградљивост, селективну полупропустљивост, активност полиелектролита, антимикробну активност, могућност стварања гела и филма, способност хелације, и апсорпциони капацитет (167). *Li* и *cap.* (133) синтетисали су порозни носач од хитосана обогаћен TGF- β 1 и успешно спровели директно прекривање пулпе паса. Порозни хитосан био је погодан носач фактора раста јер је омогућио контролисано и дуготрајно отпуштање биомолекула (133).
- Алгинат се такође користи као носач у истраживањима директног прекривања пулпе због своје биокомпатибилности, биоразградљивости, одсуства антигености и хелатних способности. Користи се као носач/скафолд у ткивном инжењерству, средство за допремање лекова и за зарастање рана (166). У истраживању *Oliva-Rodríguez* и *cap.* (134), употребљен је алгинатни гел за ношење DMP-1 и TGF- β 1 за директно прекривање пулпе. Аутори наводе да је предност овог материјала начин формирања гела на собној температури у условима који омогућавају да се биомолекули одрже и задржи њихова функција (134).
- МТА, у својим основним формулација, припрема се тако што се прашкаста компонента помеша са стерилном водом. Многи аутори, покушали су да уместо водене компоненте, користе неки од раствора биомолекула мењајући физичке и функционалне карактеристике МТА (168). У истраживању *Manochehrifar* и *cap.* (169), додавањем хлорхексидина добијена је мешавина која није умањила антиинфламаторна дејства, али је умањила способност МТА да формира дентински мост. Додавање калцијум хлорида убрзало је време везивања, али је умањило отпорност на притисак МТА у истраживању *Kogan* и *cap.* (168). Такође, *Parirokh* и *cap.* (170) показали су већи степен некрозе и запаљења и мањи успех репаративне дентиногенезе испод комбинације МТА са калцијум хлоридом. С друге стране, комбинација МТА и илопроста (простациклин – лек за лечење плућне хипертензије) показала је успех у формирању дентинског моста регуларне тубуларне грађе, без изазивања запаљенске реакције у пулпи (171). Слични резултати добијени су комбиновањем остеостатина са МТА (172) и екстракта плаценте са МТА (121).

1.5 ЕРИТРОПОЕТИН

Еритропоетин (ЕРО) представља најважнији регулатор еритропоезе, продукције црвених крвних зрнаца, и неопходан је за диференцијацију прогениторских ћелија еритроидне линије. ЕРО је гликопротеин молекуларне масе 30,4-kDa састављен од 165 аминокиселина, три тетра-антенарна N-везана гликана и један мањи O-везан гликан. N-гликани су одговорни за процесе синтезе, молекуларну стабилност, везивање за

рецептор и биоактивност ЕРО (7). ЕРО је члан породице цитокина класе I који имају компактну глобуларну структуру састављену од четири α -хеликса (173).

Током феталног развоја, ЕРО се првенствено производи у ћелијама неуралног гребена и неуроепителу, затим у хепатоцитима, док по рођењу, ту улогу преузимају перитубулусне ћелије кортекса бубрега (174). Ткивна хипоксија је главни стимулатор продукције ЕРО услед смањења концентрације хемоглобина и кисеоничког капацитета крви или услед смањеног притиска кисеоника у артеријама (173). Експресија ЕРО у хипоксији регулисана је елементом који одговара на хипоксију (енг. *hypoxia responsive element*, HRE) присутном на *EPO* гену за који се везује транскрипциони фактор HIF (енг. *hypoxia-inducible factor*). HIF је присутан као хетеродимер састављен из две субјединице, α и β . У нормоксичним условима, α субјединица је деградирана, док се њена форма стабилизује услед хипоксије када се транслоцира у једру и ступа у интеракцију са елементима HRE (175). И други транскрипциони фактори могу да регулишу експресију ЕРО као што је GATA-2 који инхибира експресију у нормоксији. Познато је да проинфламаторни цитокини као што су IL-1 и TNF- α активирају GATA-2 и тиме индиректно инхибирају експресију ЕРО (173).

Своје еритропоетске активности ЕРО остварује везивањем за ЕРО-рецептор (ЕРО-R). ЕРО-R припада породици цитокинских рецептора и експримиран је првенствено на прогениторским хематопоетским ћелијама еритроидне лозе у облику хомодимера (176). Везивањем ЕРО за рецептор долази до конформацијских промена на екстрацелуларној јединици која последично активира Јанус киназу 2 (енг. *Janus kinase 2*, JAK2). JAK2 надаље спроводи фосфорилацију тирозинских остатака на интрацелуларној јединици привлачећи низ SH2 (енг. *Src homology-2*) протеина који иницирају нисходну сигнализацију путем једног од три најчешћа сигнална пута (175):

- STAT (енг. *signal transducer and activator of transcription*) – Иако ЕРО може да активира и STAT1 и STAT3, JAK2/STAT5 је најбоље описан пут у еритроидним ћелијама. ЕРО активацијом овог пута доводи до повећања експресије антиапоптотских гена *Bcl2* и *Bcl-X*, штитећи прекурсорске ћелије од апоптозе (177).
- PI3K/Akt (енг. *phosphatidylinositol-3 kinase*) – такође је важан у остваривању еритропоетских функција ЕРО, јер активацијом PI3K/Akt сигналног пута додатно подстиче преживљавање ћелија штитећи их од апоптозе. Каскадном реакцијом овог сигналног пута постиже се активација GATA-1 транскрипционог фактора задуженог за многе еритроидне гене и антиапоптотски *Bcl-X* ген, омогућавајући крајњу диференцијацију прекурсорских ћелија (178).
- Митогеном активирани протеин киназе (енг. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) – активацијом овог сигналног пута покреће се једна од три каскаде: ERK1/ERK2, p38MAPK или стресом активирани протеин киназа/Jun киназа (SAPK/JNK). MAPK сигнални пут такође има улогу у диференцијацији или апоптози (175).

1.5.1 Функције ЕРО

Основна функција ЕРО је преживљавање, пролиферација и диференцијација прогениторских ћелија еритроцита у костној сржи. Продукција еритроцита се

континуирано спроводи у организму како би се надокнадио губитак и одржала оптимална оксигенација ткива (7).

ЕРО је активан у завршним фазама матурације еритроидних прекурсорских ћелија, најважнија мета су му CFU-E (енг. *colony-forming unit erythroid*) ћелије (179). CFU-E ћелије су познате као ћелије са најизраженијом експресијом ЕРО-R на ћелијској мембрани (173). ЕРО стимулише пролиферацију и матурацију ових ћелија од нормобласта, преко ретикулоцита у зреле еритроците (173,179). Уобичајена мала концентрација ЕРО омогућава диференцијацију малог броја прекурсорских ћелија, док ћелије без стимулације улазе у апоптозу. У случају повећане концентрације ЕРО у ткиву услед појачане продукције или егзогеног уноса, већи број ћелија преживљава и наставља диференцијацију. С тога, основни механизам дејства ЕРО на ћелије је превенција апоптозе (173).

1.5.2 Експресија ЕРО и ЕРО-R у ткивима

У одраслом организму ЕРО се примарно експримира на месту највеће производње, односно у фибробластним ћелијама бубрежног интерстицијума између бубрежних тубула (174). Међутим, место производње се разликује у ембрионалном развоју организма. *Suzuki* и сар. (180) показали су на ембриону миша да се производња ЕРО у првим недељама ембрионалног развоја највише одвија у ћелијама неуралног гребена и неуроепитела, одакле синтетисани ЕРО стимулише примитивну еритропоезу у жуманчаној кеси. У каснијим стадијумима ембриогенезе, продукција ЕРО и процеси еритропоезе премештају се у феталну јетру, у којој су хепатоцити главни извор ЕРО. Интересантно, у фазама производње у јетри, ЕРО остварује паракрино дејство делујући на локално присутне прекурсорске еритроидне ћелије, док је током неуралне и бубрежне производње дејство ЕРО ендокрино (174).

До сада је познато да постоје екстра-ренални извор ЕРО у организму, међутим, екстра-ренални извори производе ЕРО у значајно мањим количинама у односу на бубреге. Најпознатији други извор у одраслом организму је јетра, а следи је мождамо ткиво. У јетри, ЕРО производе хепатоцити и стелатне ћелије, док у мозгу продукцију спровode неурони и астроцити (181,182). На нивоу mRNA, експресија ЕРО детектована је и у ћелијама плућа, слезине, тестиса и плаценте (183–185). Такође, *in vitro* је показано да церебралне и аортне ендотелијалне ћелије, одонтобласти и ћелије зубне пулпе у хипоксији, имају способност продукције ЕРО (8,186,187).

ЕРО-R је осим на прекурсорским ћелијама еритроидне линије (CFU-E) експримиран на мноштву других ћелија. Слично ЕРО, ЕРО-R експримиран је ћелијама мозга, срца, плућа, женског и мушког репродуктивног ткива, али и ретине, скелетних мишића, масног ткива, гастроинтестиналног тракта, панкреаса и тумора (179,188). Такође, присуство ЕРО-R показано је на мембранама имунских ћелија (9,189).

Присуство ЕРО-R показано је у здравој и инфламираној хуманој зубној пулпи. У здравој је највећа експресија показана у одонтобластима, фибробластима и ендотелијалним ћелијама, а у инфламираној показано је присуство и на инфламаторним ћелијама. Значајно присуство ЕРО показано је у инфламираној пулпи на граничним зонама запаљенског инфилтрата, у близини каријесне лезије (8). Међутим, досадашњим истраживањима није показано присуство ЕРО и ЕРО-R у зубној

пулпи пацова као ни експресија узрокована експонирањем и директним прекривањем пулпе.

1.5.3 Ефекти ЕРО изван хематопоезе

Проналазак експресије ЕРО-R у различитим органима и ткивима довео је до откривања нових функција ендогеног ЕРО у нехематопоеетским ткивима, као и терапијских ефеката егзогеног ЕРО у модулацији одбрамбених и репаративних механизма након различитих повреда. Управо због многобројних ефеката на различити ткива, ЕРО се сматра „плеиотропним“ цитокином (9). ЕРО стимулише регенерацију повређених ткива кроз стимулацију ангиогенезе, смањење апоптозе ћелија, редукцију проинфламаторних цитокина и стимулацију миграције и диференцијације прогениторских и матичних ћелија (9,10,188,190,191).

ЕРО је важан фактор ангиогенезе у ембрионалном развоју, јер је показано да животиње са делецијом гена за ЕРО и ЕРО-R имају дефекте у ангиогенези (192). Такође, ове животиње показују и дефекте у развоју мозга, што указује на важност ЕРО сигнализације у можданом развоју (193). ЕРО-R експримиран је на ендотелијалним ћелијама, а његова активација стимулише пролиферацију и ангиогенетски потенцијал ових ћелија (194). Такође, *Westenbrink* и сар. (195) показали су да ЕРО учествује у одговору ткива на исхемијске повреде, као што је исхемија срца, стимулишући формирање нових крвних судова (неоваскуларизацију). Показано је да ЕРО стимулише и опоравак мијелина након исхемијских или инфламацијских оштећења у можданом и нервном ткиву (196,197). ЕРО стимулише продукцију кости кроз директну стимулацију пролиферације и диференцијације матичних ћелија костне сржи у остеобласте, али и индиректно кроз стимулацију матичних ћелија хематопоезе да продукцију ВМР или остеокласта да експримирају *EphrinB2*, фактор који стимулише диференцијацију остеобласта (198). Претпоставља се да ЕРО у инфламацији зубне пулпе има улогу у ангиогенези, али могуће и у промоцији пролиферације и диференцијације пулпних ћелија и у неурогенези (8). Показано је да ЕРО стимулише ангиогенезу у *DPSC in vitro* (199).

1.5.3.1 Ткивно-заштитни рецептор

Ћелије у нехематопоеетским ткивима иако поседују ЕРО-R, он није присутан у свом уобичајеном хомодимерском, већ у хетеродимерском облику са β CR (енг. *β common receptor*) рецептором. Овако формиран рецептор у литератури се назива **ткивно-заштитни рецептор** (енг. *tissue-protective receptor*, TPR) и значајан је фактор у зарастању и опоравку повређеног ткива (189).

Одговор ткива на повреду узроковану патогеном, траумом или хипоксијом пролази кроз основне фазе запаљенског одговора активацијом проинфламаторних цитокина, екстравазације циркулишућих фагоцитних ћелија, формирања едема и тромбозе оближњих крвних судова. Како би се овај одбрамбени процес, али у исто време оштећујући по околно ткиво, зауставио, корегулаторни заштитни процес се истовремено активира предвођен експресијом TPR, а затим и одговарајућег лиганда (ЕРО). ЕРО везивањем за TPR инхибира проинфламаторне цитокине, активност макрофага и процес апоптозе у околним ћелијама (200). TPR такође промовише

миграцију васкуларних и ткиву специфичних матичних ћелија успостављајући репарацију ткива (200,201).

TPR је експримиран на моноцитима, макрофагима, дендритским ћелијама, Т и В лимфоцитима, због чега се сматра да ЕРО поседује имуномодулаторне карактеристике (202). Досадашња истраживања показала су различите ефекте ЕРО на ћелије урођене и стечене имуности (189).

Експресија TPR и продукција ЕРО у ћелијама повређеног ткива подстакнути су инфламаторним сигнаlima и хипоксијом околног ткива која је изазвана едемом и тромбозом крвних судова. У ћелијама које експримирају TPR такође се активирају процеси апоптозе (200). С друге стране, показано је да је за активирање продукције ЕРО потребно и до неколико часова, што може узроковати недостатак његовог дејства на заустављање деструкције ткива (203). Додатно, проинфламаторни цитокини присутни у повређеном ткиву, попут TNF- α , инхибирају његову експресију (189). Све наведено доводи у питање ефикасност ендогено произведеног ЕРО у зарастању рана, због чега су спроведена бројна истраживања примене екзогеног ЕРО као медикамента са терапијским ткивно-заштитним ефектима.

1.5.4 Терапијски ефекти ЕРО

Први подаци о терапијским ефектима ЕРО добијени су након изолације пречишћеног ЕРО из урина пацијената са анемијом 1977. године. 1985. године две групе аутора успеле су да клонирају *EPO* ген и произведу рекомбинантни хумани ЕРО (енг. *recombinant human EPO*, rhEPO) који је значајно допринео у терапији анемије узроковане хроничном бубрежном инсуфицијенцијом, туморима или HIV инфекцијом (204). Циљеви терапије применом rhEPO су да се елиминише потреба за трансфузијом крви и умање негативни ефекти недостатка кисеоника на периферна ткива као што су мозак и срце, а тиме повећа квалитет живота пацијената (205). Међутим, присуство ЕРО-R у различитим нехематопоеским ткивима довело је до истраживања терапијских ефеката rhEPO на моделима болести у различитим ткивима укључујући кожу, скелетне мишиће, кости, мозак, ретину, кичмену мождину, срце, оралну слузокоже, пародонцијум и др. (10,188,189,206–212).

Рекомбинантни ЕРО доступан је у облицима ероетин алфа и beta који су добијени из ћелија оваријума кинеског хрчка, ероетин omega који се добија из ћелија бубрега хрчака и darbepoetin алфа који се добија из истих ћелија као ероетин алфа и beta али са изменом у једној аминокиселини што му омогућава боља фармакокинетичка својства (205).

Системска и локална употреба rhEPO у терапији акутних и хроничних повреда коже показала је значајне ефекте ЕРО у зарастању ране (213–215). Системска употреба rhEPO показала је убрзано зарастање ране, појачану ангиогенезу и повећање колагених компоненти у мишијем моделу (216). Слично је показано и студијом *Vuemi* и сар. (217) где је локална субкутана употреба rhEPO убрзала зарастање ране и допринела повећању ангиогенезе, али и смањењу инфламације и у моделу исхемичне ране пацова. Резултати студија показали су да примена rhEPO инхибира леукоците и инфилтрацију моноцита/макрофага у рани и продукцију проинфламаторних цитокина IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ , и TNF- α (215). Такође, показано је да rhEPO доприноси побољшаном зарастању рана активацијом имунорегулаторног TGF- β 1 (210).

Применом rhEPO у склопу носача од депротеинизоване говеђе кости добијено је потпуно зарастање коштаног дефекта једнако примени аутологног коштаног трансплантата. Такође, rhEPO на носачу промовисао је експресију VEGF доприносећи ангиогенези у зарастању коштаног дефекта (191). Li и сар. (218) испитивали су локалну примену раствора rhEPO у зарастању екстракционе ране пацова и показали значајно веће попуњавање коштаног дефекта и мањи губитак висине алвеоларног гребена. Додатно, *in vitro* су демонстрирали да EPO промовише диференцијацију и активност одонтобласта (218). Локална употреба хидрогела који садржи EPO убрзала је зарастање рана у моделу оралног мукозитиса пацова, као и регенерације пародонталног ткива у експерименталном моделу пародонтопатије пацова (207,212).

На основу података о експресији EPO и EPO-R у многим нехематопоетским ћелијама и повећању њихове експресије и активности у случајевима оштећења ткива, као и значајних ефеката примене rhEPO у зарастању, постављени су циљеви овог истраживања.



2. ЦИЉ

СТУДИЈЕ

2. ЦИЉ СТУДИЈЕ

Главни циљеви нашег истраживања су испитивања експресије еритропоетина и еритропоетинског рецептора у експонираној и директно прекривеној зубној пулпи пацова и испитивања ефеката еритропоетина на инфламацију и стварање репараторног дентина у терапији директним прекривањем инфламиране зубне пулпе.

На основу циљева постављени су следећи експериментални задаци:

1. Имунохистохемијски и qRT-PCR анализом утврдити експресију EPO и EPO-R у здравој пулпи и упоредити са налазима у експонираној и у зубној пулпи прекривеном калцијум хидроксидом или МТА
2. Хистолошком анализом проценити степен инфламације ткива и формирања дентинског моста експониране и зубне пулпе прикривене са калцијум хидроксидом, МТА, rhEPO или комбинацијом МТА+rhEPO
3. Применом qRT-PCR анализе утврдити експресију цитокина (TNF- α , INF- γ , IL-1 β , IL-6, GRO, IL-10 и TGF- β 1) и маркера одонтобластне активности (ALP, OCN, DSPP, DMT-1) у здравој, експонираној и пулпи прекривеној калцијум хидроксидом, МТА, rhEPO или комбинацијом МТА+rhEPO.
4. Биохемијском анализом утврдити вредности параметара оксидативног стреса (TBARS, NO $_2^-$, O $_2^-$, H $_2$ O $_2^-$, CAT, SOD, GSH) у узорцима крви експерименталних животиња са здравом, експонираном и пулпом прекривеном калцијум хидроксидом, МТА, rhEPO или комбинацијом МТА+rhEPO.

2.1 РАДНЕ ХИПОТЕЗЕ

1. Постоји разлика у експресији EPO и EPO-R у експонираној нетретираној пулпи у односу на зубну пулпу прекривену са калцијум хидроксидом или МТА и здраву пулпу.
2. Постоји разлика у степену инфламације у експонираној нетретираној пулпи у односу на директно прекривену пулпу.
3. Постоји разлика у степену инфламације у пулпи директно прекривеној калцијум хидроксидом или МТА у односу на пулпу директно прекривену применом rhEPO и комбинације МТА+rhEPO.
4. Доћи ће до формирања дентинског моста на директно прекривеној пулпи.
5. Постоји разлика у експресији инфламаторних цитокина у експонираној нетретираној пулпи у односу на директно прекривену пулпу.
6. Постоји разлика у експресији инфламаторних цитокина у пулпи директно прекривеној калцијум хидроксидом или МТА у односу на пулпу директно прекривену применом rhEPO и комбинације МТА+rhEPO.
7. Постоји експресија маркера одонтобластне активности у директно прекривеној пулпи.
8. Постоји разлика у експресији маркера одонтобластне активности у пулпи директно прекривеној применом rhEPO и комбинацијом МТА+rhEPO у односу на пулпу директно прекривену са калцијум хидроксидом или МТА.
9. Постоји разлика у вредностима параметара оксидативног стреса између група животиња са здравом, експонираном и директно прекривеном пулпом.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ



3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1 ЕТИЧКО ОДОБРЕЊЕ

Сви експерименти одобрени су од стране Етичке комисије за добробит огледних животиња Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу (бр. протокола: 01-6210, бр. одобрења: 01-7192/2). Експерименталне процедуре спроведене су у складу са директивом Европске уније за добробит лабораторијских животиња (2010/63/EU), директивом Савета европских заједница (86/609/ЕЕС), принципима добре лабораторијске праксе и смерницама за истраживања на животињама и извештавања *in vivo* експеримената (енг. *Animal Research: Reporting In Vivo Experiments*, ARRIVE) (219).

3.2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ

Истраживање је спроведено на пацовима соја *Wistar* ($n=48$) мушког пола, старости осам недеља, просечне масе 250 ± 50 g, одгајане у виваријуму Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Животиње су биле изложене стандардној исхрани са неограниченим приступом храни и води (*ad libitum*) у условима уобичајене температуре ($22-25^{\circ}\text{C}$) и влажности ваздуха (50%), са дневно/ноћним циклусима од 12 часова.

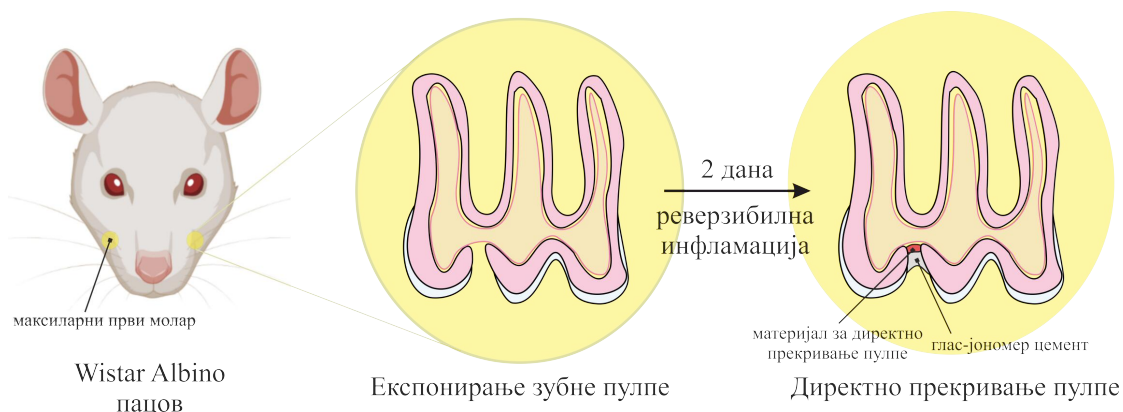
3.2.1 Снага студије и величина узорка

Величина узорка за сваку од група ($n=10$) израчуната је на основу резултата студије сличног дизајна (220) коришћењем софтвера *G*Power 3.1.9.7 (Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Dusseldorf, Germany)* одређивањем вредности алфа (α) од 0,05 и снаге студије од 0,8 за Т-тест (два независна узорка), упоређујући групе између себе (у оба смера) и узимајући у обзир могућност губитка узорка од 10%.

3.3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО ЕКСПОНИРАЊЕ И ДИРЕКТНО ПРЕКИРВАЊЕ ПУЛПЕ

Пре отпочињања процедуре, експерименталне животиње ($n_z=60$) анестезиране су интраперитонеалном инјекцијом кетамин хидрохлорида (80mg/kg) и ксилазина (10mg/kg). На оклузалним површинама левих и десних првих молара ($n_m=100$) препарисан су кавитети применом стерилних округлих карбидних сврдала, величине 1/2 (*FG.TC 1/2; Micro Diamond Technologies, Afula, Israel*) уз константну иригацију радног поља. Након достизања дубине препарације од око 1mm извршено је експонирање зубне пулпе применом стерилног ендодонтског инструмента типа К-турпије величине *ISO 30/02 (KFS03021; Dentsply Sirona, New York, USA)*. Кавитети су остављени експонирани наредних 48 часова, а животиње враћене у кавезе и праћене.

По истеку 48 часова животиње су поново анестезиране на претходно описан начин. Кавитети су испрани физиолошким раствором, осушени стерилним папирним поенима и дезинфиковани папирним поеном натопљеним 2% раствором натријум хипохлорита. Постављен је материјал за директно прекривање у сваки од кавитета, а затим су кавитети испуњени светлосно полимеризујућим глас-јономер цементом (*Fuji II LC; GC Europe, Leuven, Belgium*) (**Фигура 4.**).



Фигура 4. Илустровани приказ процедуре експерименталног експонирања и директног прекривања зубне пулпе. Експонирање зубне пулпе извршено је на оклузалним површинама левог и десног првог максиларног молара пацова соја Wistar Albino. Након експонирања, зубне пулпе су остављене експонирани наредна 2 дана (48 сати) ради изазивања реверзибилни инфламације. Потом, оклузалне површине су прекривене материјалом и испуном од глас-јономер цемента.

Животиње су враћене у кавезе и праћене током четири недеље. Једном недељно праћено је постојање испуна на моларима након излагања експерименталних животиња краткотрајној етарској наркози. Сви зуби на којима није уочено постојање испуна у периоду праћења од четири недеље, искључени су из даљих анализа.

3.3.1 Груписање експерименталних животиња

Експерименталне животиње су насумично распоређене у шест група зависно од коришћеног материјала за директно прекривање:

- I. **rhEPO** (*Recormon 2000IU/0,3ml; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany*) ($n_z=10$): припремљена је стерилна ресорптивна говеђа колагена мембрана (*BioMend; Zimmer Biomet Dental, FL, USA*) исечена на комаде величине 1x1 mm и натопљена са 5 μ l rhEPO (2000IU/0,3ml) и постављена на експонирани пулпе левих и десних максиларних молара ($n_m=20$);
- II. **Ca(OH)₂** (*Dycal; Dentsply Sirona, New York, USA*) ($n_z=10$): калцијум хидроксид припремљен је према упутствима произвођача и постављен на експонирани пулпе левих и десних максиларних молара ($n_m=20$);
- III. **MTA** (*MTA Biorep; ITENA Clinical, Paris, France*) ($n_z=10$): МТА припремљен је према упутствима произвођача и постављен на експонирани пулпе левих и десних максиларних молара ($n_m=20$);
- IV. **MTA+rhEPO** ($n_z=10$): МТА припремљен је према упутствима произвођача уз примену rhEPO раствора уместо течне компоненте материјала и постављен на експонирани пулпе левих и десних максиларних молара ($n_m=20$);
- V. **експонирана контрола** (енг. *exposure control, EC*) ($n_z=10$): експонирана пулпа левих и десних максиларних молара ($n_m=20$) прекривена је колагеном мембраном (BioMend) натопљеном са капи стерилне воде.
- VI. **здрава контрола** (енг. *healthy control, HC*) ($n_z=10$): Експерименталне животиње којима није извршено експонирање и директно прекривање пулпе.

3.3.2 Жртвовање експерименталних животиња и прикупљање узорака

По истеку периода праћења од четири недеље, животиње су жртвоване. Непосредно пре жртвовања експерименталне животиње су изложене краткотрајној

етарској наркози. Жртвовање је извршено цервикалном дислокацијом, након чега су прикупљени узорци крви у епрувете са антикоагулантним средством и узорци максила и зуба.

Малим хируршким маказама, коштаном ткивом максиле одвојено је од околних меких ткива, а затим су одвојени узорци максила од осталих костију кранијума. Пресецањем по средини непца и између секутића, одвојени су узорци леве и десне максиле. Лева максила коришћена је цела у даљим поступцима, док су из десне максиле екстраховани први молари постављањем врха хируршког скапела у периодонтални простор у пределу фуркације коренова применом луксационих покрета.

3.4 ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА

Имунохистохемијско бојење спроведено је ради испитивања дистрибуције ћелија експониране и директно прекривене зубне пулпе позитивних на експресију ЕРО и ЕРО-Р. За наведену анализу коришћени су изоловани узорци леве максиле.

3.4.1 Фиксација и парафинизација ткивних узорака

Иоловане леве максиле подвргнуте су поступцима фиксације и декалцификације ради припреме за имунохистохемијску и хистолошку анализу. Узорци су првенствено фиксирани у 4% параформалдехиду у трајању од 24 часа. По истеку времена, ткиво је подвргнуто декалцификацији у 10% раствору етилендиаминтетрасирћетне киселине (EDTA) у фосфатном пуферу у трајању од три недеље. Након декалцификације, узорци су испрани текућом водом и подвргнути дехидратацији растућим концентрацијама алкохола, праћена применом ксилола, испаравањем ксилола на 56-60°C и уградњом парафина у ткивне узорке. Узорци су потом укалупљени у парафинске блокове. Ткивни пресеци дебљине 5µm добијени су сечењем узорака у мезио-дисталном смеру на ротирајућем микротому. Ткивни пресеци су четкицом пренесени у водено купатило на 45°C, где су прикупљени предметним стаклима. За имунохистохемијску анализу коришћена су позитивно наелектрисана адхезивна предметна стакла (*Superfrost-OT Ultra Plus; Gerhard Menzel, Braunschweig, Germany*), а за хистолошку, стандардна предметна стакла (*Epredia, Breda, Netherlands*). Исечци ткива на предметним стаклима сушени су у термостату на 56°C у трајању од 12 сати. На сваком пресеку су се налазили први и други максиларни молар у целисти (круница и цео корен) са трећим моларом присутним на појединим пресецима.

3.4.2 Имунохистохемијско бојење ткивних исечака

Имунохистохемијско бојење спроведено је на парафинским исечцима дебљине 5µm. Процесу бојења претходила је депарафинизација ткива излагањем исечака 60 минута температуре од 58°C и потапањем у ксилол два пута по 10 минута. Уследио је поступак рехидратације ткива у опадајућим концентрацијама алкохола, након чега је обављено откривање епитопа термичком обрадом исечака у 0,01mol/l На-цитрату (pH=6,0) у трајању од 21 минут. По хлађењу, ткивни исечци су испирани у PBS-у (енг. *phosphate buffered saline*) три пута. Уследила је инактивација ендogene пероксидазе додавањем *Hydrogen Peroxide Block-a (Abcam, Cambridge, UK)* на ткивне исечке, а затим инкубација на собној температури у трајању од 10 минута праћено испирањем PBS-ом два пута. На препарате је додат *Protein Block-a (Abcam)* праћено инкубацијом у трајању 10 минута и испирањем PBS-ом. Уследило је додавање 150µl раствора

примарног антитела у PBS-у са 1% 1:200 BSA (енг. *Bovine serum albumin*) на ткивне исечке. Као примарна, коришћена су поликлонална антитела ЕРО (*E-AB-70191*; *Elabscience Biotechnology, Houston, TX, USA*) или ЕРО-Р (*E-AB-12396*; *Elabscience Biotechnology*). Ткивни исечци су потом инкубирани у влажној комори на собној температури у трајању од 60 минута праћено испирањем PBS-ом три пута. На исечке је потом додато 100µl *Streptavidin Peroxidase-a* (*Abcam*) након чега је уследила инкубација у трајању 10 минута и испирање PBS-ом. Потом је додато три капи DAB (енг. *3,3'-diaminobenzidine*) хромогена праћено одговарајућом инкубацијом и испирањем исечка у дестилованој води. Испрани исечци потопљени су у Мајеров (*Mayer*) раствор хематоксилина (*Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA*) на два минута. По обављеном бојењу, спроведени су претходно описани поступци дехидратације и просветљавања. Ткивни исечци су потом прекривени воденим медијумом и покровним стаклом, а затим сушени у трајању од 48 сати на собној температури.

Исечци су анализирани *DM4000B* светлосним микроскопом (*Leica Microsystems, Wetzlar, Germany*) и фото-документовани *DMC295* камером (*Leica Microsystems*) и *Qwin V3* софтвером (*Leica Microsystems*). Бројање позитивно обојених ћелије извршено је у програму *ImageJ 1.53* (*National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*) на 10 непреклапајућих видних поља,.

3.5 ХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА

Хистолошка анализа спроведена је у циљу евалуације одговора (инфламације и репаративне дентиогенезе) пулног ткива пацова на експонирање и директно прекривање различитим материјалима.

3.5.1 Бојење ткивних исечка хематоксилин-еозином (H/E)

Парафински ткивни исечци, подвргнути претходно описаним поступцима депарафинизације и рехидратације, бојени су хематоксилином и еозином. Након рехидратације, ткивни исечци су бојени Мајеровим раствором хематоксилина (*Sigma Aldrich*) 10 минута, а затим еозином (*Sigma Aldrich*) у временском интервалу од два минута. Уследио је поступак дехидратације ткивних исечка у растућим концентрацијама алкохола, праћен поступком просветљавања потапањем ткивних исечка 60 секунди у претходно припремљен раствор ксилола и алкохола у размери 1:1, а затим два пута по 60 секунди у чистом ксилолу. Крајњи поступци били су наношење канада балзама (*Canada balsam; Centrohem, Stara Pazova, Serbia*), постављање покровних стакала на ткивне исечке и сушење исечка на собној температури 24 часа.

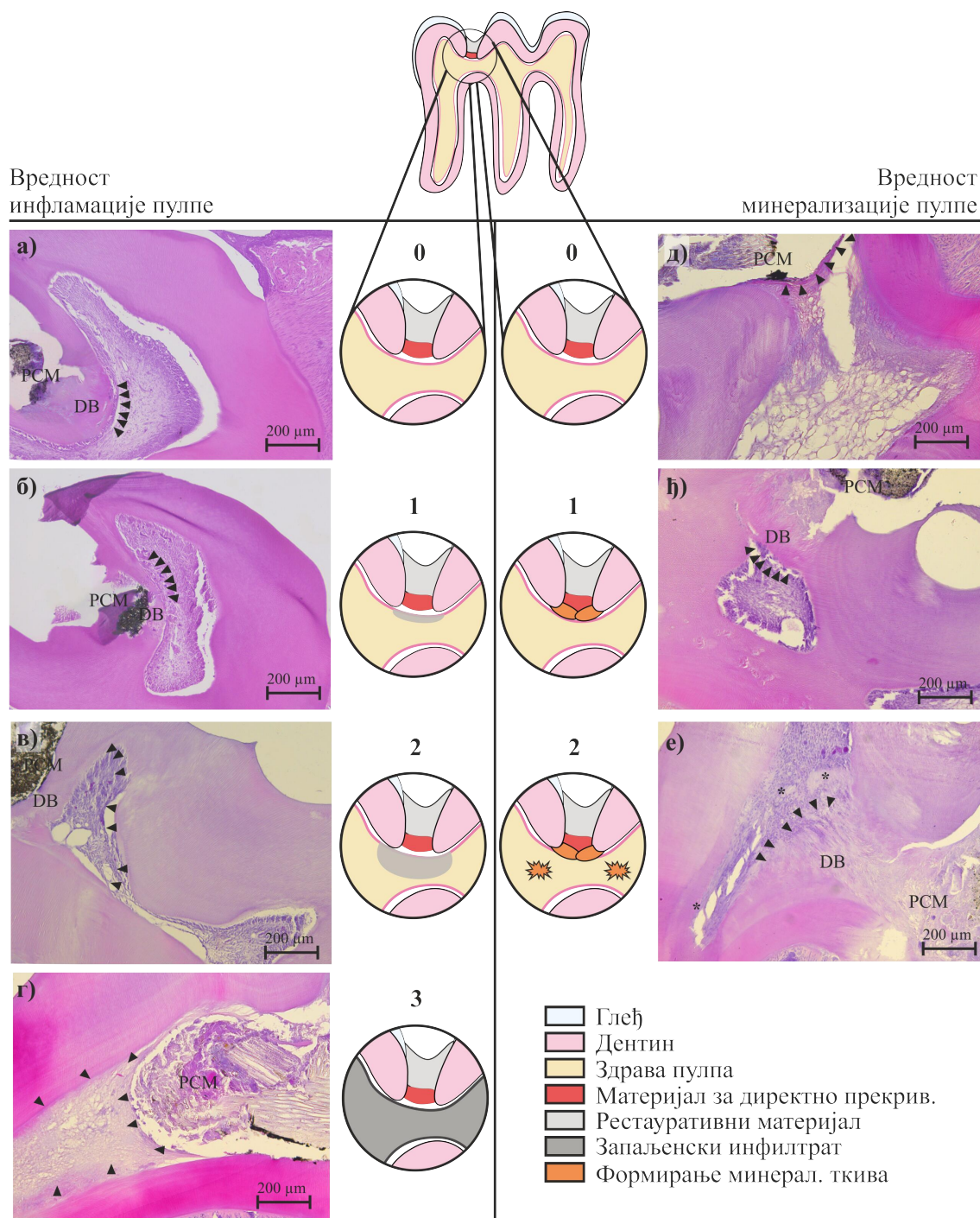
3.5.2 Евалуација инфламације и минерализације зубне пулпе

Инфламација и минерализација зубне пулпе на ткивним исечцима анализирани су *DM4000B* светлосним микроскопом (*Leica Microsystems*) и фото-документовани *DMC295* камером (*Leica Microsystems*) и *Qwin V3* софтвером (*Leica Microsystems*).

Степен инфламације и минерализације квантификовани су на основу претходно описане скале за процену одговора зубне пулпе пацова на основу инфламације и формирања минерализованог ткива (161,221) приказане у **табели 1** и на **фигури 5**.

Табела 1. Критеријуми за евалуацију одговора зубне пулпе пацова на основу вредности инфламације и минерализације

Вредност	Опис
Инфламација пулпе	
0	Инфламаторне ћелије нису присутне или постоје у веома малом броју
1	Блага: присуство инфламаторних ћелија само уз дентински мост или подручје експонирања зубне пулпе
2	Средња: инфламаторне ћелије присутне су у делу круничне зубне пулпе
3	Изразита: целокупна крунична зубна пулпа је инфилтрирана инфламаторним ћелијама или некротична
Минерализација пулпе	
0	Нема трагова минерализације у зубној пулпи
1	Појачана депозиција чврстог ткива на површини експонираног ткива зубне пулпе
2	Изразита депозиција минералних ткива у круничном пулпном ткиву



Фигура 5. Схематски приказ и репрезентативне фотографије реакције зубне пулпе на експонирање и директно прекривање. Врхови троуглова показују на посматрану зону од интереса. Вредности инфламације пулпе представљене су на панелима а, б, в и г. а) Вредност 0 је представљена као изостанак инфламаторног инфилтрата у зубној пулпи испод материјала за директно прекривање; б) Вредност 1 се описује као блага инфламација са увећањем крвних судова и инфилтратом испод дентинског моста; в) Вредност 2 је представљена инфламацијом умереног нивоа која обухвата део коронарне зубне пулпе; г) Вредност 3 представља изразит инфламаторни одговор у коме инфилтрат или некроза захвата читаву коронарну пулпу. Вредности минерализације пулпе представљене су на панелима д, е и ж: д) Вредност 0 представља недостатак знакова минерализација зубне пулпе; е) Вредности 1 представља делимичну или потпуну формацију дентинског моста на месту контакта материјала и зубног ткива; ж) Вредности 2 се описује као екстензивна минерализација пулпе унутар ткива коронарне пулпе; DB – дентински мост, РСМ – материјал за директно прекривање пулпе, * - зоне минерализације унутар коронарне пулпе.

3.6 АНАЛИЗА ТКИВНЕ ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА МЕТОДОМ КВАНТИТАТИВНЕ ЛАНЧАНЕ РЕАКЦИЈЕ ПОЛИМЕРАЗЕ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ

Применом квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену (енг. *Quantitative Real Time - Polymerase Chain Reaction*, qRT-PCR) одређене су експресије гена за ЕРО, ЕРО-Р, цитокине и маркере одонтобластне активности у експонираној и директно прекривеној зубној пулпи пацова.

3.6.1 Изолација RNA и реверзна транскрипција комплементарне DNA

Из узорка десне максиле екстраховани су први максиларни молари и постављени у епрувете запремине 1,5ml (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) у које је претходно сипан *RNA later Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)* и чуване на -20°C до поступка хомогенизације. Узорци ткива су механички хомогенизовани након дубоког замрзавања течним азотом. RNA је изолована у 1ml *TRIzol Reagent-a (Thermo Fisher Scientific)* према протоколу произвођача.

Након инкубације на собној температури 5 минута, у 1ml *TRIzol Reagent-a* додато је 0,2ml хлороформа (*Serva, Heidelberg, Germany*) праћено центрифугирањем на 15000g (RCF) 15 минута на $+4^{\circ}\text{C}$. По центрифугирању јасно су одвојене три фазе узорка. Површна бистра фаза пребачена је у нове епрувете запремине 1,5ml (*Eppendorf AG*) у које је додато по 0,5ml изопропанола (*Serva*) праћено инкубацијом 10 минута на собној температури и центрифугирањем на 12000g (RCF) 10 минута на $+4^{\circ}\text{C}$. Пажљиво је одливен супернатант, а на преосталу RNA наливено је 1ml 70% етанол алкохола (*Sani-Hem, Novi Sad, Serbia*) праћено центрифугирањем на 7500g (RCF) 5 минута на $+4^{\circ}\text{C}$. Одливен је супернатант, а епрувете су постављене у водено купатило ради испаравања преосталог алкохола. Добијена RNA растворена је у 20 μl воде без нуклеаза (*Sigma-Aldrich*), а добијени раствори чувани су на -80°C до даљих анализа.

Извршена је процена приноса RNA из сваког узорка у виду мерења концентрације и оцене чистоће из 3 μl узорка на *Multiskan SkyHigh UV/VIS* спектрофотометру (*Thermo Fisher Scientific*). Принос је оцењен као оптималан у случајевима односа A_{260}/A_{280} између 1,75 и 2,00.

Комплементарна DNA (енг. *complementary DNA, cDNA*) је синтетисана применом *RevertAid and First Strand cDNA Synthesis* китова (*Thermo Fisher Scientific*) из 1,5 μg укупне RNA у присуству *oligo(dT)* прајмера према упутствима произвођача. Укратко, мешавина RNA узорака са *oligo(dT)* прајмерима инкубирана је на 42°C 60 минута, а затим на 70°C 5 минута ради деактивације ензима у апарату *MultiGene OptiMax Thermal Cycler (Labnet International, Edison, NJ, USA)*.

3.6.2 Квантификација релативне експресије гена

Експресија гена од интереса процењена је на основу релативне експресије информационе RNA (енг. *messenger RNA, mRNA*) у односу на *housekeeping* ген у сваком од узорака.

У смешу за qRT-PCR додато је 10 μl *SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)* праћено додавањем изабраних прајмера (**Табела 2.**) у концентрацији од 500nM (*Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA*), 100ng *cDNA* узорка и воде без нуклеаза (*Sigma-Aldrich*) до постизања запремине од

20 μ l према упутствима произвођача. β -actin је коришћен за нормализацију као *housekeeping* ген. Реакције су спроведене у Gentier 96E qRT-PCR систему (*Xi'an Tianlong Science and Technology, Xi'an City, China*). Почетна денатурација обављена је 95°C 30 секунди праћено са 40 циклуса у два корака: денатурација на 95°C 15 секунди и анилинг и елонгација на 60°C 30 секунди. Након спроведених циклуса, анализирана је крива топљења, а реакције су контролисане применом NTC (енг. *No Template Control*) контролних реакција. Нивои релативне експресије гена израчунати су применом $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Резултати су приказани као средња вредност дупликата сваког узорка, а нивои релативне експресије *mRNA* за сваки од узорака представљени су као однос експресије гена од интереса и *housekeeping* гена.

Табела 2. Прајмери коришћени у qRT-PCR анализи

Назив прајмера	Секвенца (5'-3')
Rat EPO Primer Pair	F: CTCTGGGCCTCCCAGTC R: TGTTCCGGAGTGGAGCAG
Rat EPO-R Primer Pair	F: CTCTTACCAGCTCGAAGGTGA R: TCCAGGACCTCCACCSTTTGT
Rat TNF-α Primer Pair	F: GTAGCCCACGTCGTAGCAAA R: CCCTTCTCCAGCTGGAAGAC
Rat IL-1β Primer Pair	F: TGATGTTCCCATTAGACAGC R: GAGGTGCTGATGTACCAGTT
Rat IFN-γ Primer Pair	F: GCTAGATTCTGGTGACAGCTGGTG R: CACCAGCTGTCACCAGAATCTAGC
Rat IL-6 Primer Pair	F: CTTCCAGCCAGTTGCCTTCT R: GACAGCATTTGGAAGTTGGGG
Rat GRO Primer Pair	F: CTCCAGCCACACTCCAACAGA R: CACCCTAACACAAAACACGAT
Rat IL-10 Primer Pair	F: CAGTCAGCCAGACCCACAT R: GCTCCACTGCCTTGCTTT
Rat TGF-β1 Primer Pair	F: TTTAGGAAGGACCTGGGTTG R: CAGACAGAAGTTGGCATGGT
Rat ALP Primer Pair	F: CATCGGACCCTGCCTTAC R: GGAGACGCCCATACCATC
Rat OCN Primer Pair	F: TAAGGTGGTGAATAGACTCCG R: TAAACGGTGGTGCCATAGAT
Rat DSPP Primer Pair	F: ATGGGACACAGCAGGATAGGC R: CACTTCCGTCCTTCCGTTAGAC
Rat DMP-1 Primer Pair	F: CCGATAAGGAGGAGGATGAAGA R: ACTGGACTGTGTGGTGTCTGC
Rat β-actin Primer Pair	F: ACGGTCAGGTCATCACTATCG R: GGCATAGAGGTCTTTACGGATG

F – forward; R – reverse.

3.7 БИОХЕМИЈСКО ОДРЕЂИВАЊЕ СИСТЕМСКИХ ПРООКСИДАТИВНИХ И АНТИОКСИДАТИВНИХ ПАРАМЕТАРА

У тренутку жртвовања пацова сакупљени су узорци крви потребни за одређивање системских прооксидативних и антиоксидативних параметара. Првенствено, крв је центрифугирана како би се раздвојили еритроцити од крвне плазме. У току центрифугирања одваја се доња фаза (црвени слој) коју чине еритроцити и горња фаза (жути слој), коју чини плазма. Плазма је одливена у епрувете запремине 1,5ml (*Eppendorf*), а преостали еритроцити подвргнути су поступцима испирања до добијања лизата.

Нивои прооксидативних параметара мерени су у крвној плазми укључујући индекс пероксидације липида (енг. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS), нитрите (NO_2^-), супероксид анион (O_2^-) и водоник пероксид (H_2O_2), док су у лизату еритроцита одређени активност ензимског антиоксидативног система проценом концентрације каталазе (енг. *catalase*, CAT) и супероксид дисмутазе (енг. *superoxide dismutase*, SOD), и активност редукованог глутатиона (GSH). Сви параметри одређивани су *UV-1800* спектрофотометром (*Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan*).

3.7.1 Одређивање индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS)

Индекс липидне пероксидације одређиван је индиректно мерењем продуката реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином, односно нивоа TBARS.

У 400 μl крвне плазме дода се 200 μl 28% трихлорсирћетне киселине праћено вортексовањем узорака и остављањем 15 минута на леду. Следи центрифугирање узорака на 6000 обртаја у минути (енг. *revolutions per minute*, rpm) у трајању од 15 минута. Из добијене смеше узима се 400 μl супернатанта у који се додаје 100 μl 1% раствора 2-тиобарбитурна киселине и натријум хидроксида. Овако припремљена смеша инкубирана је у воденом купатилу у трајању од 15 минута на 100°C, а затим на собној температури 10 минута. Апсорбанца је мерена спектрофотометријски на $\lambda=530\text{nm}$. Дестилована вода је служила као слепа проба. Добијене вредности су приказане као nmol TBARS/ml плазме.

3.7.2 Одређивање нитрита (NO_2^-)

Одређивање количине нитрита у узорку представља индиректну методу одређивања ослобођеног азот монооксида.

У епрувете запремине 1,5ml (*Eppendorf*) редом је додато 100 μl перхлорне киселине, 400 μl 20mM етилендиаминтетраацетатне киселине и 200 μl узорка крвне плазме. Након вортексовања и остављања 15 минута на леду, смеша је центрифугирана на 6000rpm 15 минута. Одливен је супернатант, а у талог је додато 220 μl калијум карбоната. У нове епрувете запремине 1,5ml (*Eppendorf*) додато је 200 μl претходно направљене смеше, 250 μl Griess-овог реагенса и 125 μl пуфера за NO. Након инкубације на собној температури у трајању од 15 минута, апсорбанца је мерена спектрофотометром на $\lambda=550\text{nm}$. За слепу пробу коришћена је дестилована вода. Добијене вредности су приказане као nmol NO_2^- /ml плазме.

3.7.3 Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)

У епрувете 12×100mm (*Chemland, Stargard, Poland*) додато је 50μl узорка крвне плазме и 950μl есејне смеше. Есејна смеша (енг. *assay mixture*) представља смешу 50mM TRIS-HCl (трис (хидроксиметил) аминотетан-хлороводонична киселина) пуфера (pH=8,6), 0,1mM етилендиаминтетраацетатне киселине, 0,1mg/ml желатина и 0,1mM нитротетразолијум плавог. Апсорбанца је мерена три пута сваких 60 секунди при таласној дужини $\lambda=550\text{nm}$. За слепу пробу коришћена је дестилована вода. Добијене вредности су приказане као pmol O_2^- /ml плазме.

3.7.4 Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)

Мерење концентрације водоник пероксида спроведено је додавањем 10μl пероксидазе рена и 800μl раствора фенол црвеног у 200μl узорка плазме. Након инкубације на собној температури од 10 минута, мерена је апсорбанца при $\lambda=610\text{nm}$. За слепу пробу коришћена је дестилована вода.

Концентрације H_2O_2 у узорцима крвне плазме израчунате су помоћу стандардне криве, формиране на основу стандардног раствора H_2O_2 . У три епрувете је додато по 5, 10 и 20μl H_2O_2 стандарда, 200μl дестиловане воде, 800μl раствора фенол црвеног и 10μl пероксидазе рена. Након инкубације измерене су финалне концентрације. На основу односа финалне апсорбанце узорка и стандардне криве израчунат је фактор апсорбанце. На основу односа финалне апсорбанце узорка и фактора апсорбанце добијене су коначне вредности приказане као pmol H_2O_2 /ml плазме.

3.7.5 Одређивање каталазе (CAT)

Активност каталазе одређена је у претходно разблаженом лизату еритроцита. Разблажење је постигнуто додавањем 10ml дестиловане воде и 100μl 70% етанол алкохола у 100μl лизата еритроцита. У 50μl пуфера за САТ додато је 100μl претходно припремљеног разблажења и 1ml 10mM H_2O_2 . За слепу пробу коришћена је дестилована вода. Мерења су поновљена 6 пута за сваки узорак. Апсорбанца је мерена у кварцним киветама при $\lambda=230\text{nm}$ и приказана као јединица активности по граму хемоглобина ($U/g Hb \times 10^3$).

3.7.6 Одређивање супероксид дисмутазе (SOD)

У епрувету 12×100mm додато је 100μl лизата еритроцита и 1ml карбонатног пуфера. Након вортексовања смеше, додато је још 100μl адреналина. За слепу контролу коришћена је смеша раствора без узорка. Мерења апсорбанце су обављена у дупликату при $\lambda=470\text{nm}$ и приказана су као $U/g Hb \times 10^3$.

3.7.7 Одређивање редукованог глутатиона (GSH)

Нивои GSH у лизату еритроцита одређени су додавањем 50μl узорка у епрувету запремине 1,5ml (*Eppendorf*) праћено додавањем 200μl 0,1% раствора етилендиаминтетраацетатне киселине и 385μl преципитационог пуфера. Ова смеша остављена је 15 минута на леду, а затим центрифугирана на 4000rpm 10 минута до добијања екстракта. У нове епрувете додато је 300μl екстракта, 750μl динатријум

хидроген фосфата и 100 μ l 5,5–дитио–бис–6,2–нитробензоеве киселине. Након инкубације смеше на собној температури 10 минута, мерена је апсорбанца на $\lambda=412\text{nm}$. лизата еритроцита и 1ml карбонатног пуфера. Након вортексовања смеше, додато је још 100 μ l адреналина. Добијене вредности су приказане као nmol GSH/ml еритроцита.

3.8 СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Статистичка обрада података извршена је у статистичком софтверу *IBM SPSS Statistics for Windows v23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)*. За процену нормалности расподеле података коришћен је *Shapiro–Wilk* тест нормалности. У зависности од нормалности расподеле коришћени су *Kruskal-Wallis H* и *Mann-Whitney U* тестови (непараметарски) или *One-Way ANOVA* и *Independent Samples T*-тест (параметарски). Резултати су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација (*mean \pm standard deviation (SD)*), табеларно и графички. Вредност $p < 0,05$ постављена је као индикатор статистичке значајности. У интерпретацији тестираних хипотеза коришћена је Бонферонијева (*Bonferroni*) метода корекције вишеструких тестирања (α^*).

4. РЕЗУЛТАТИ



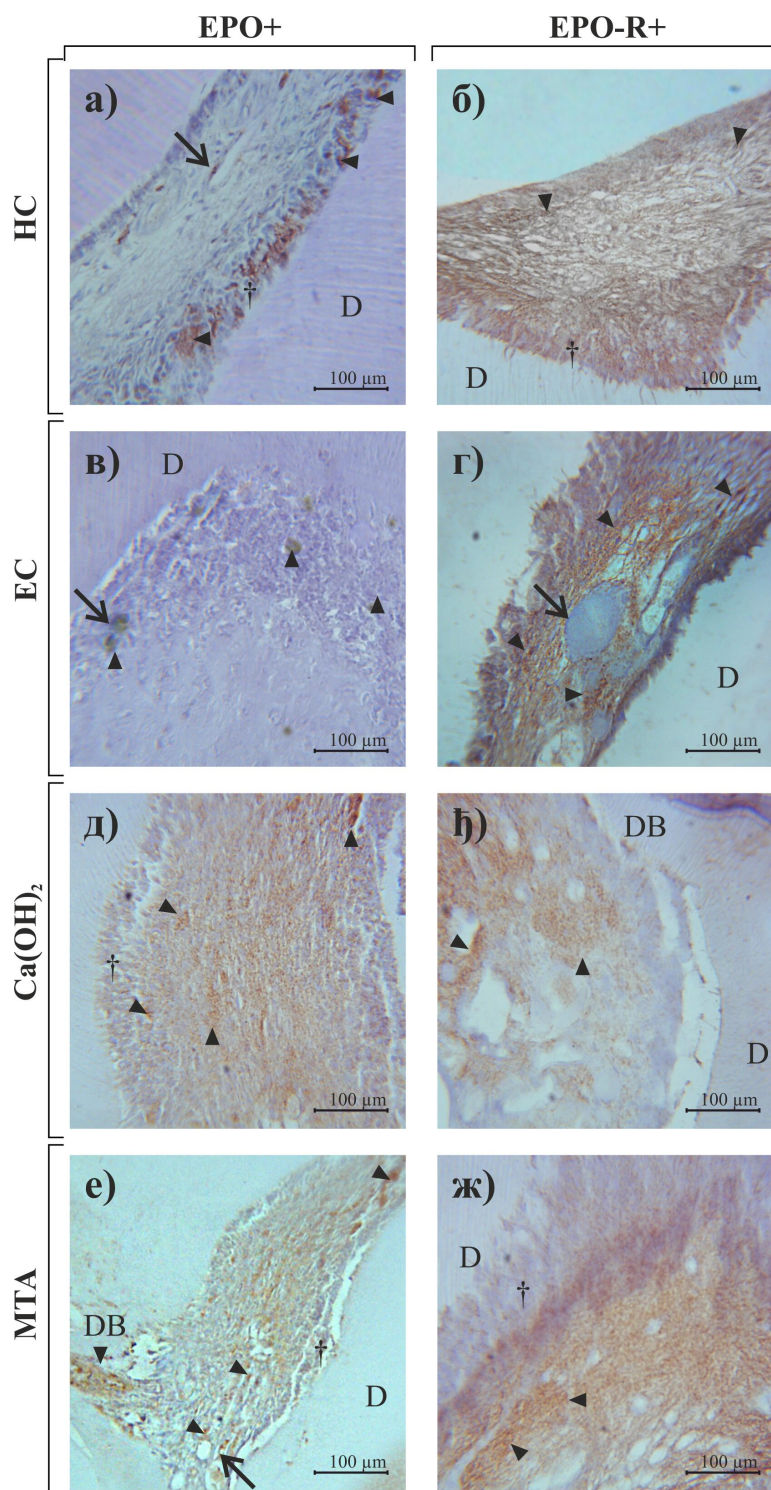
4. РЕЗУЛТАТИ

4.1 ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ ЕРО И ЕРО-Р У ЕКСПОНИРАНОЈ И ДИРЕКТНО ПРЕКРИВЕНОЈ ПУЛПИ

Од укупног броја првих молара леве максиле ($n_m=60$), 5 узорака било је искључено из имунохистохемијске анализе због непостојања зубног испуна након четири недеље праћења експерименталних животиња и то: 2 из $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 1 из МТА и 2 из ЕС групе.

Имунохистохемијско бојење спроведено је ради испитивања дистрибуције ћелија експониране и зубне пулпе директно прекривене применом $\text{Ca}(\text{OH})_2$ или МТА позитивних на експресију ЕРО и ЕРО-Р.

Имунохистохемијска анализа показала је присуство ЕРО+ и ЕРО-Р+ ћелија у експонираној и директно прекривеној пулпи (**Слика 1.**). Статистички значајна разлика ($p<0,05$) постојала је у експресији ЕРО+ ћелија између ЕС групе и група $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и МТА. Експониране зубне пулпе прекривене материјалима ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ и МТА) су показале већу експресију ЕРО+ ћелија у зонама испод репаративног дентинског моста као и око крвних судова. ЕРО-Р+ ћелије у свим групама биле су присутне дифузно по ткиву пулпе (**Слика 1.**).



Слика 1. Експресија ЕРО+ и ЕРО- R + хелија у ткивним исечцима здраве зубне пулпе, експониране и зубне пулпе након директног прекривања различитим материјалима, имунохистохемијско бојење. Репрезентативне фотографије ткивних пресека првих максиларних молара након имунохистохемијског бојења за ЕРО+, леви панели (а, в, д и е) и имунохистохемијског бојења за ЕРО- R +, десни панели (б, г, ђ и ж). Панели а) и б) представљају узорке здраве контроле; панели в) и г) представљају узорке експониране контроле; панели д) и ђ) представљају узорке зубне пулпе директно прекривене применом Са(ОН)₂; панели е) и ж) представљају узорке зубне пулпе директно прекривене применом МТА; троугао – позитивна експресија ЕРО или ЕРО- R , D – дентин, DB – дентински мост, † – очуван одонтбластни слој, стрелица – крвни суд.

4.2 ХИСТОЛОШКА ЕВАЛУАЦИЈА ЗУБНЕ ПУЛПЕ НАКОН ЕКСПОНИРАЊА И ДИРЕКТНОГ ПРЕКРИВАЊА

Од укупног броја првих молара леве максиле ($n_m=60$), поред претходно описаних 5 узорака додатно је искључен из хистолошке анализе 1 узорак из rhEPO групе због непостојања испуна након четири недеље.

Хистолошком анализом исечака након Н/Е бојења посматране су морфолошке карактеристике пулпо-дентинског комплекса, присуство инфламаторних ћелија и формирање и карактеристике репаративног дентинског моста.

Рутинско хематоксилин-еозин бојење круничне пулпе здраве контроле (НС) пружа детаљни преглед карактеристика уобичајеног пулпо-дентинског комплекса (**Слика 2.а и б**). У коронарној пулпи уочава се непрекинути слој примарног дентина, предентина, слој одонтобласта са издуженим и преклопљеним ћелијским телима, више или мање правилно распоређених. Испод слоја одонтобласта уочава се зона сиромашна ћелијама, а идући ка сржи пулпе и зона богата ћелијама испуњена бројним фибробластима и појединим имунским ћелијама. Срж пулпе сачињавају претежно фибробласти и колагена влакна. Такође се уочавају појединачни крвни и лимфни судови.

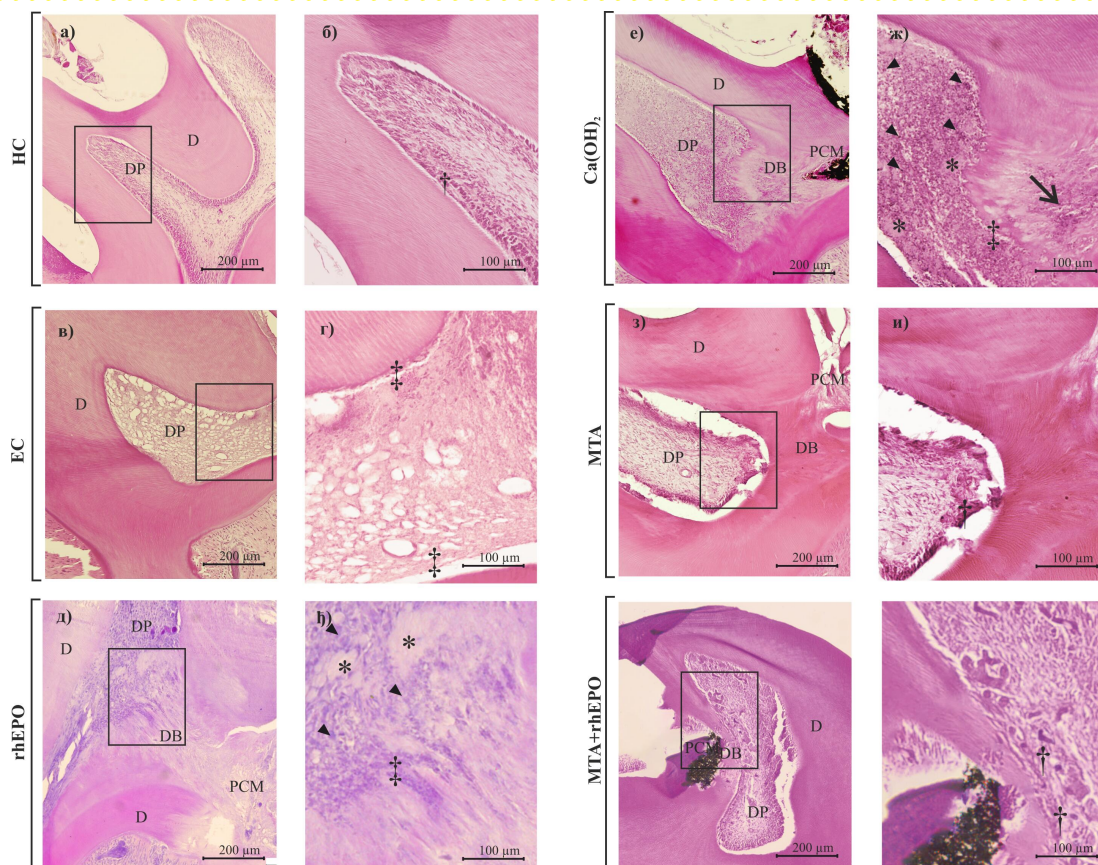
С друге стране, хистолошки пресеци експониране контроле (ЕС) показали су пулно ткиво са знацима јаке инфламације и некрозе круничне пулпе (**Слика 2.в и г**). Услед експонирања, слој примарног дентина и предентина је прекинут, а услед инфламаторних и некротичних промена, одонтобластни слој у потпуности је изгубљен. Вејлову зону и зону богату ћелијама није било могуће распознати, а срж пулпе изгубила је своју фибробластну структуру. У узорцима који су показивали знаке изразите инфламације, уочено је дифузно присуство многобројних имунских ћелија. Скоро на свим узорцима показано је одсуство знакова минерализације пулпе.

Узорци зубне пулпе директно прекривених колагеном мембраном натопљеном са rhEPO показали су различит хистолошки налаз, од одсуства инфламације до изразите инфламације. Највећи број узорака показао је средњи степен инфламације окарактерисане инфламаторним инфилтратом у круничној пулпи и вазодилатацијом крвних судова (**Слика 2.д и ђ**). С друге стране, највећи број узорака показао је знаке минерализације и потпуно формираног дентинског моста. Минерализација је често била дифузна у круничној пулпи.

Хистолошки налаз зубне пулпе прекривене $\text{Ca}(\text{OH})_2$ такође је показао различите степене инфламације са одсуством и умереном инфламацијом као најчешће налазе (**Слика 2.е и ж**). Скоро сви узорци показали су формирање дентинског моста и минерализацију зубне пулпе. Дентински мост често је садржао ћелијске инклузије и тзв. „тунел дефекте“.

Директно прекривање пулпе применом МТА на хистолошким пресецима најчешће је било праћено одсуством инфламације пулпе и потпуно формираним дентинским мостом тубуларне грађе, сличне примарном дентину (**Слика 2.з и и**). На појединим узорцима детектована је умерена инфламација коју је карактерисало веће накупљање имунских ћелија испод дентинског моста и губитак одонтобластног слоја.

Резултати хистолошке анализе узорака зубне пулпе прекривене комбинацијом МТА+rhEPO показали су одсуство инфламације у највећем броју случајева, са потпуно формираним дентинским мостом као и у МТА групи (**Слика 2.ј и к**).



Слика 2. Хистолошки изглед здраве зубне пулпе, експониране и зубне пулпе након директног прекривања различитим материјалима, *H/E* бојење. Репрезентативне фотографије ткивних пресека првих максиларних молара. Леви панели (а, в, д, е, з и ј) представљају приказ на увећању од 10x са четвороугаонцима који означавају зоне увећања 20x и које су приказане на десним панелима (б, г, ђ, ж, и и к); D – дентин, DP – зубна пулпа, DB – дентински мост, PCM – материјал за директно прекривање, † – очуван одонтобластни слој, ‡ – изгубљен слој одонтобласта, стрелица – ћелијске инклузије унутар минерализованог ткива, троугао – инфламаторни инфилтрат, * – поља минерализације унутар пулног ткива.

4.2.1 Квантификација хистолошких резултата

Квалитативне карактеристике инфламације и минерализације зубне пулпе у контролним и експерименталним групама квантификоване су на основу скале приказане у **Табели 1**. Резултати евалуације хистолошког налаза инфламације и минерализације пулпе приказани су у **Табели 3**.

Табела 3. Резултати хистолошке евалуације вредности инфламације и минерализације зубне пулпе након експонирања и директног прекривања.

Група	Вредност (број узорака/укупан број)				p
	0	1	2	3	
Инфламација пулпе					
rhEPO	1/9	3/9	4/9	1/9	<0,05*
Ca(OH) ₂	2/8	3/8	2/8	1/8	<0,05*
MTA	4/9	3/9	2/9	0/9	<0,05*
MTA+rhEPO	5/10	3/10	2/10	0/10	<0,001**
ЕС	0/8	0/8	1/8	7/8	
Укупно	12/44	12/44	11/44	9/44	
Минерализација пулпе					
rhEPO	3/9	3/9	3/9		<0,05*
Ca(OH) ₂	2/8	4/8	2/8		<0,05*
MTA	2/9	5/9	2/9		<0,05*
MTA+rhEPO	2/10	6/10	2/10		<0,05*
ЕС	7/8	1/8	0/8		
Укупно	15/44	21/44	8/44		

Резултати су приказани као однос броја узорака са одређеном вредношћу и укупног броја експерименталних животиња у групи;

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у односу на експонирану контролу (ЕС) (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест);

** статистички значајна разлика ($p < 0,001$) у односу на експонирану контролу (ЕС) (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест).

Просечна вредност инфламације пулпе износила је $1,39 \pm 1,10$, а минерализације пулпе $0,84 \pm 0,71$. Разлике у вредностима инфламације достигле су ниво статистичке значајности између група ($p < 0,001$) са највећом вредношћу у зубној пулпи експониране контроле (ЕС: $2,88 \pm 0,35$), праћено групама rhEPO ($1,56 \pm 0,88$), Ca(OH)₂ ($1,25 \pm 1,04$), MTA ($0,78 \pm 0,83$) и MTA+rhEPO ($0,70 \pm 0,82$) (**График 1.а**). Просечне вредности степена минерализације пулпе биле су једнаке у групама у којима је спроведено директно прекривање пулпе (rhEPO: $1,00 \pm 0,71$; Ca(OH)₂: $1,00 \pm 0,77$; MTA: $1,00 \pm 0,71$; MTA+rhEPO: $1,00 \pm 0,67$), док је најнижа вредност детектована у ЕС групи ($0,13 \pm 0,35$) (**График 1.б**). Разлике у вредностима минерализације пулпе достигле су ниво статистичке значајности ($p < 0,005$) у поређењу група са директним прекривањем и ЕС групе (**График 1.б**).

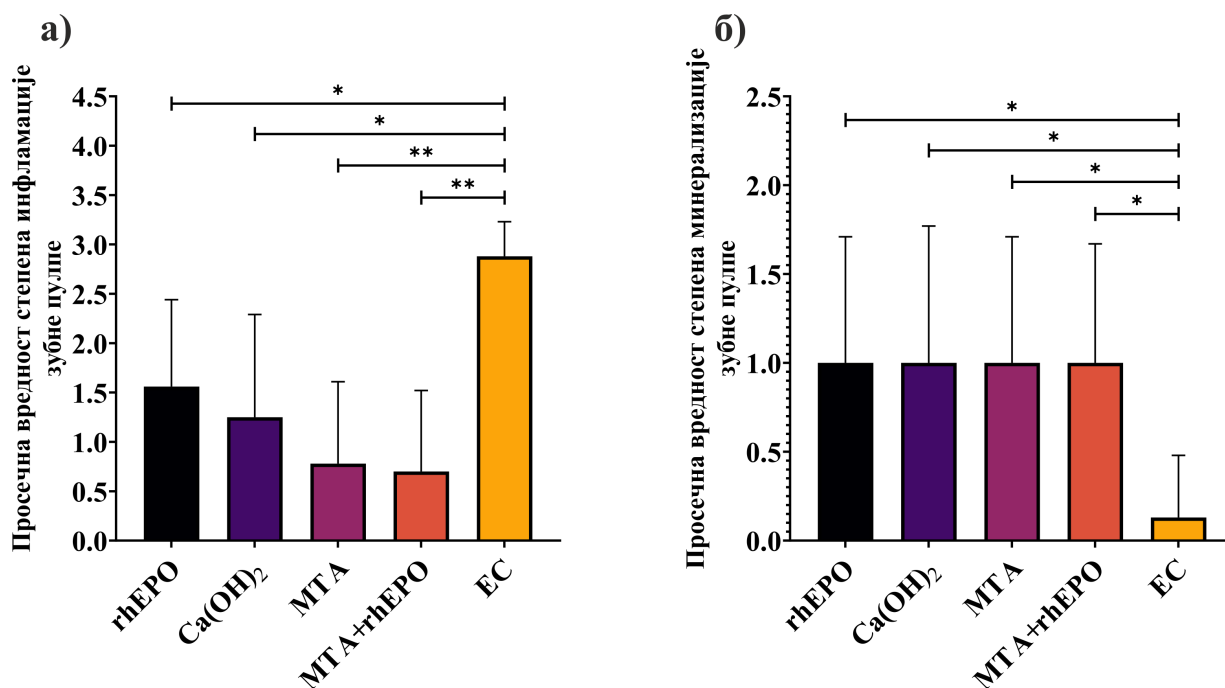


График 1. Просечне вредности степена (а) инфламације и (б) минерализације директно прекривене зубне пулпе (rhEPO, Ca(OH)₂, МТА и МТА+rhEPO) у односу на експонирану контролу (ЕС). а) Степен инфламације зубне пулпе у ЕС групи био је статистички значајно виши у поређењу са rhEPO и Ca(OH)₂ групама ($p < 0,05$) и МТА и МТА+rhEPO групама ($p < 0,001$); б) Све групе директно прекривених зубних пулпи показале су статистички значајно виши ($p < 0,05$) степен минерализације у односу на ЕС групу; Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($mean \pm SD$); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) (Kruskal-Wallis post-hoc тест)

4.3 АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈА ГЕНА У ЕКСПОНИРАНОЈ И ДИРЕКНО ПРЕКРИВЕНОЈ ПУЛПИ

Од укупног броја првих молара десне максиле ($n_m=60$), 5 узорака било је искључено из qRT-PCR анализе због непостојања зубног испуна након четири недеље праћења експерименталних животиња и то: 2 из Ca(OH)₂, 2 из МТА и 1 из ЕС групе.

4.3.1 Ткивна експресија EPO и EPO-R у експонираној и директно прекривеној пулпи

Применом qRT-PCR методе процењене су промене нивоа релативне експресије гена за EPO и EPO-R у директно прекривеној зубној пулпи применом Ca(OH)₂ и МТА и експонираној контроли (ЕС) у односу на здраву контролу (НС) као референтном вредности (вредности НС приказана као 1) (Табела 4. и Графици 2. и 3.).

Табела 4. Релативна експресија гена за ЕРО и ЕРО-Р у узорцима зубне пулпе директно прекривене применом $\text{Ca}(\text{OH})_2$ или МТА и експонираној контроли.

Ген од интереса	Релативна експресија (mRNA) (средња вредност \pm стандардна девијација)		
	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	МТА	ЕС
ЕРО	1,30 \pm 0,43	2,48 \pm 1,03*	0,90 \pm 0,05
ЕРО-Р	1,61 \pm 2,59*	1,51 \pm 0,84*	5,82 \pm 1,20

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација (*mean* \pm *SD*);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у односу на ЕС групу (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест).

Релативна експресија гена за ЕРО била је статистички значајно већа ($p < 0,05$) у МТА групи (2,48 \pm 1,03) у односу на ЕС групу (0,90 \pm 0,05) и $\text{Ca}(\text{OH})_2$ групу (1,30 \pm 0,43). $\text{Ca}(\text{OH})_2$ група, није показала значајно вишу релативну експресију у односу на ЕС групу ($p > 0,05$). Међутим, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и МТА групе показале су статистички значајно вишу ($p < 0,05$) релативну експресију гена за ЕРО у односу на НС групу, док је ЕС група показала значајно нижу релативну експресију ($p < 0,05$) у односу на НС групу (**График 2.**).

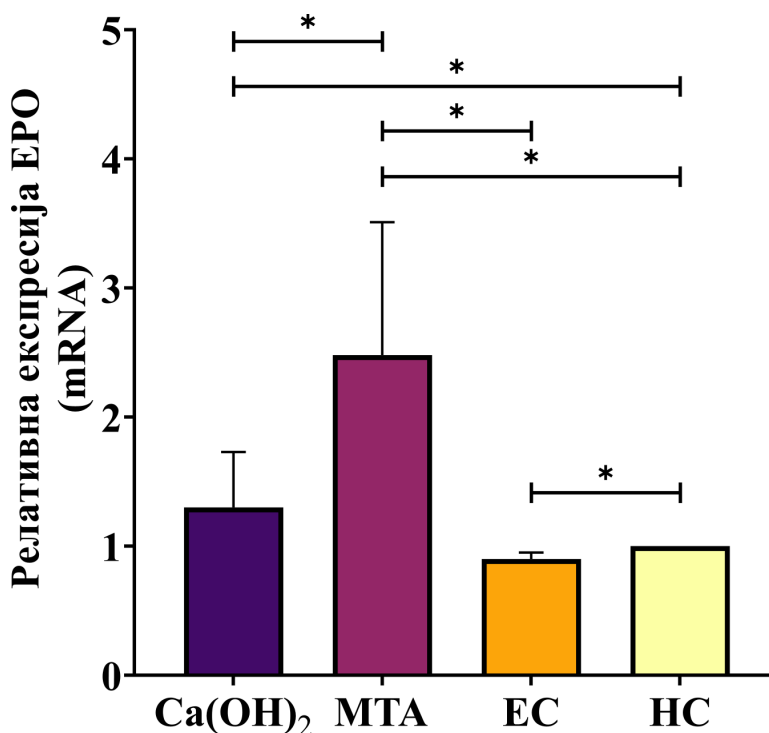


График 2. Релативна експресија гена за ЕРО у зубној пулпи прекривеној применом $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и МТА и експонираној контроли (ЕС) у односу на здраву контролу (НС). Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у експресији гена за ЕРО између $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и МТА, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и НС, МТА и ЕС, МТА и НС, ЕС и НС. Није постојала статистички значајна разлика ($p > 0,05$) између $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и ЕС; Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација (*mean* \pm *SD*); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест)

Анализа релативне експресије гена за ЕРО-Р показала је статистички значајну разлику између $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и МТА група ($p < 0,05$) у односу на ЕС групу (1,61 \pm 2,59 и 1,51 \pm 0,84 према 5,82 \pm 1,20). Међутим, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и МТА групе нису показале статистичку значајну разлику међусобно као и у односу на НС групу ($p > 0,05$).

Релативна експресија гена за ЕРО-R била је статистички значајно већа ($p < 0,05$) у ЕС групи у односу на НС групу (**График 3.**).

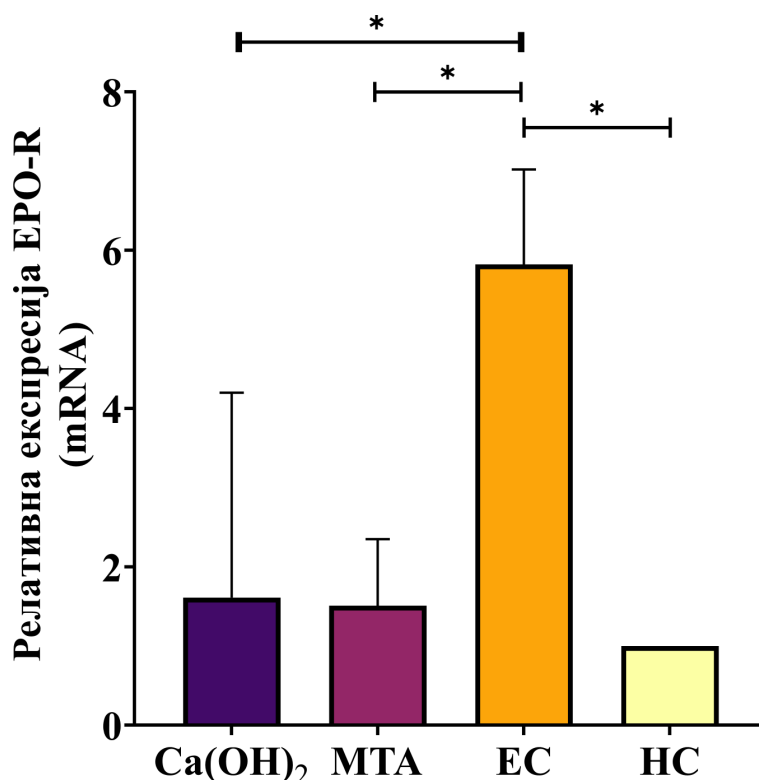


График 3. Релативна експресија гена за ЕРО-R у зубној пулпи прекривеној применом Ca(OH)₂ и МТА и експонираној контроли (ЕС) у односу на здраву контролу (НС). Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у експресији гена за ЕРО-R између Ca(OH)₂ и ЕС, МТА и ЕС и ЕС и НС група. Није постојала статистички значајна разлика ($p > 0,05$) између Ca(OH)₂ и МТА, Ca(OH)₂ и НС и МТА и НС група; Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean ± SD*); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест)

4.3.2 Ткивна експресија цитокина у експонираној и директно прекривеној пулпи

У наставку истраживања испитиване су разлике у ткивној експресији гена за цитокине након директног прекривања пулпе применом rhЕРО и МТА+rhЕРО у поређењу са експонираном, затим зубном пулпом директно прекривеном применом Ca(OH)₂ и МТА и здравом контролом (НС). Детектоване разлике процењиване су на основу промене нивоа релативне експресије гена за различите цитокине, према, НС групи као референтној вредности (вредности НС приказана као 1) (**Графици 4.-6.**).

Експресија гена за проинфламаторне цитокине TNF- α , IL-1 β и IFN- γ , била је статистички значајно виша ($p < 0,001$) у ЕС групи у односу на НС групу (**График 4.**). Резултати релативне експресије гена за TNF- α , IL-1 β и IFN- γ у групама са директним прекривањем и експонираној контроли приказани су у **Табели 5.**

Табела 5. Релативна експресија гена за TNF- α , IL-1 β и IFN- γ у узорцима зубне пулпе директно прекривене применом rhEPO, Ca(OH)₂, МТА или МТА+rhEPO и експонираној контроли.

Ген од интереса	Релативна експресија (mRNA) (средња вредност \pm стандардна девијација)				
	rhEPO	Ca(OH) ₂	МТА	МТА+rhEPO	ЕС
TNF- α	2,88 \pm 1,55* ^f	1,77 \pm 0,68	2,24 \pm 1,16	1,33 \pm 1,16* ^e	8,80 \pm 6,34** ^f
IL-1 β	4,79 \pm 2,06* ^f	2,63 \pm 2,19* ^e	3,90 \pm 1,20	2,25 \pm 2,02* ^e	22,75 \pm 16,36** ^f
IFN- γ	3,11 \pm 3,19** ^c	0,68 \pm 0,73* ^e	0,62 \pm 0,81* ^d ** ^e	1,89 \pm 0,47* ^e	3,57 \pm 1,69

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација (*mean \pm SD*);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у односу на другу групу (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест);

** статистички значајна разлика ($p < 0,001$) у односу на другу групу (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест);

b – у односу на Ca(OH)₂; c - у односу на МТА; d – у односу на МТА+rhEPO; e – у односу на ЕС; f – у односу на НС.

Релативна експресија гена за TNF- α била је статистички значајно виша ($p < 0,05$) у rhEPO групи у односу на НС групу. Иако је релативна експресија била статистичка значајно нижа ($p < 0,05$) само у МТА+rhEPO групи, **График 4.а** показује да су сви материјали за директно прекривање довели до умањења релативне експресије гена за TNF- α у односу на ЕС групу. rhEPO група показала је статистички значајну ($p < 0,05$) повишену релативну експресију гена за IL-1 β у односу на НС групу. Слично као за TNF- α , релативна експресија гена за IL-1 β била је нижа у свим групама са директним прекривањем пулпе у односу на ЕС групу (**График 4.б**), међутим, само у Ca(OH)₂ и МТА+rhEPO групама ова разлика била је статистички значајна ($p < 0,05$ и $p < 0,001$). Разлике у релативним експресијама гена за IFN- γ нису досегле ниво статистичке значајности у групама са директним прекривањем у односу на НС групу. Ca(OH)₂, МТА и МТА+rhEPO групе показале су статистички значајно нижу ($p < 0,001$) релативну експресију гена за IFN- γ у односу на ЕС групу (**График 4.в**).

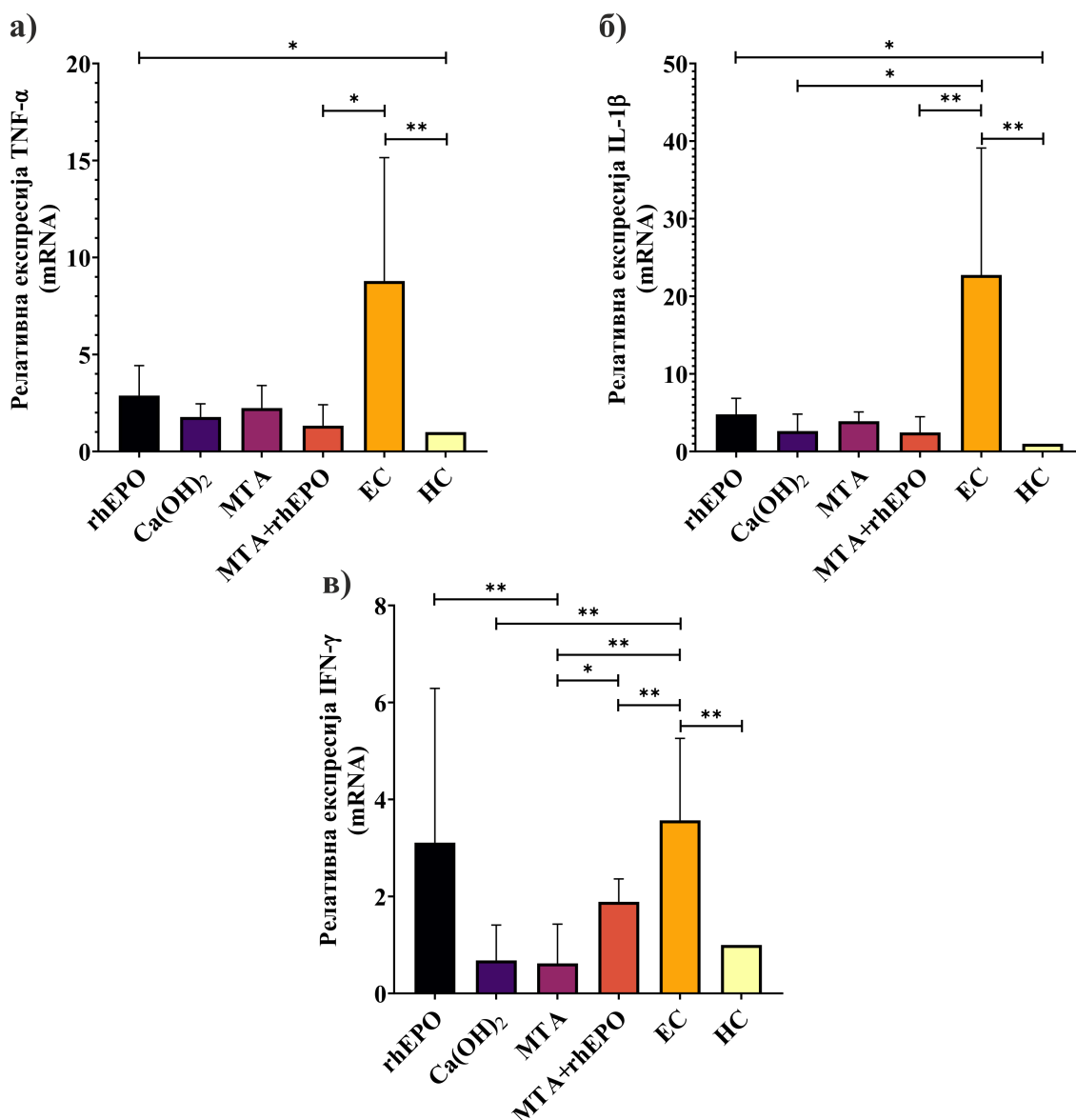


График 4. Релативна експресија гена за (а) TNF-α, (б) IL-1β и (в) IFN-γ у зубној пулпи прекривеној применом rhEPO, Ca(OH)₂, МТА и МТА+rhEPO и експонираној контроли (ЕС) у односу на здраву контролу (НС). а) Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у експресији гена за TNF-α између rhEPO и НС, Ca(OH)₂ и ЕС, МТА+rhEPO и ЕС и НС група; б) Релативна експресија гена за IL-1β била је статистички значајно различита ($p < 0,05$) између rhEPO и НС, МТА+rhEPO и ЕС и НС група; в) Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,001$) у експресији гена за IFN-γ између rhEPO и МТА, Ca(OH)₂ и ЕС, МТА и ЕС, МТА+rhEPO и ЕС и НС група. Разлика је била статистички значајна ($p < 0,05$) и између МТА и МТА+rhEPO група; Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($mean \pm SD$); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) (Kruskal-Wallis post-hoc тест); ** статистички значајна разлика ($p < 0,001$) (Kruskal-Wallis post-hoc тест)

Резултати релативне експресије гена за IL-6 и GRO у експонираној контроли и групама са директним прекривањем приказани су у Табели 6.

Табела 6. Релативна експресија гена за IL-6 и GRO у узорцима зубне пулпе директно прекривене применом rhEPO, Ca(OH)₂, МТА или МТА+rhEPO и експонираној контроли.

Ген од интереса	Релативна експресија (mRNA)				
	(средња вредност ± стандардна девијација)				
	rhEPO	Ca(OH) ₂	МТА	МТА+rhEPO	ЕС
IL-6	9,61±6,33 ^{*b f}	3,99±9,35 ^{*c d}	12,24±4,84 ^{*f}	14,29±9,25 ^{*f}	5,98±4,67
GRO	1,54 ±0,31 ^{*b **c}	0,86 ±0,96	0,21±0,09 ^{*d e f}	1,07±0,52	1,80±1,75

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean ± SD*);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у односу на другу групу (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест);

** статистички значајна разлика ($p < 0,001$) у односу на другу групу (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест);

b – у односу на Ca(OH)₂; c - у односу на МТА; d – у односу на МТА+rhEPO; e – у односу на ЕС; f – у односу на НС.

Релативна експресија гена за IL-6 и GRO није била статистички значајно различита ($p > 0,05$) у ЕС групи у односу на НС групу, ни у односу на групе са директним прекривањем (**График 5.**). Групе rhEPO, МТА и МТА+rhEPO показале су статистички значајно вишу ($p < 0,05$) релативну експресију гена за IL-6 у односу на НС, али и Ca(OH)₂ групу (**График 5.а**). Релативна експресија гена за GRO у МТА+rhEPO групи била је статистички значајно виша ($p < 0,05$) у односу на МТА групу (**График 5.б**). Статистички значајно виша ($p < 0,05$) експресија гена за GRO детектована је и поређењем rhEPO групе са Ca(OH)₂ и МТА групама (**График 5.б**).

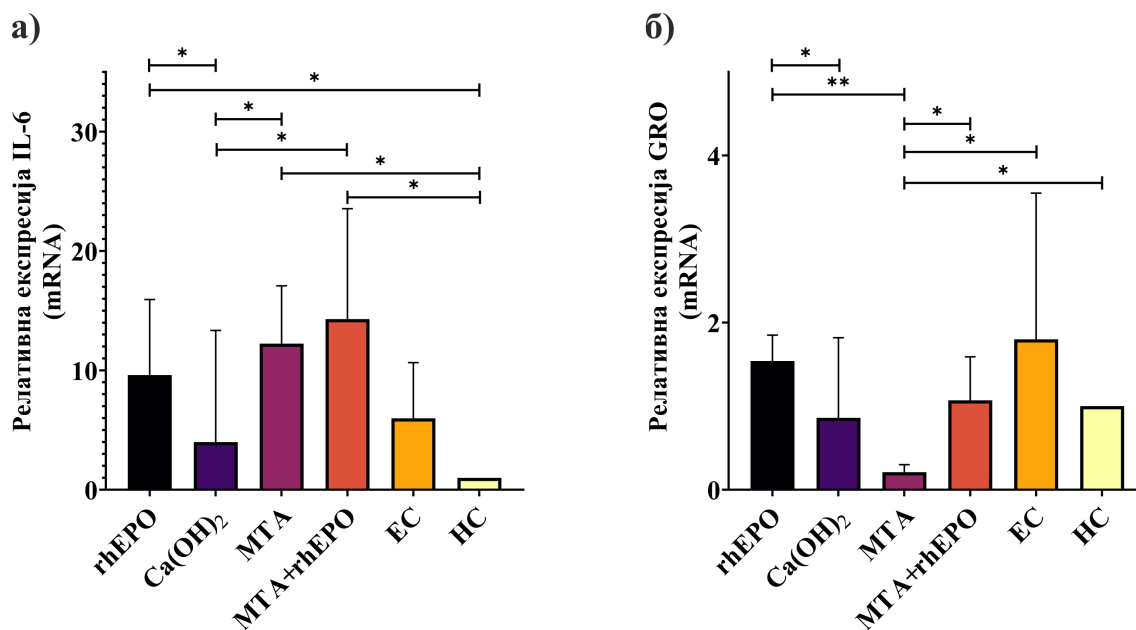


График 5. Релативна експресија гена за (а) IL-6 и (б) GRO у зубној пулпи прекривеној применом rhEPO, Ca(OH)₂, МТА и МТА+rhEPO и експонираној контроли (ЕС) у односу на здраву контролу (НС). а) Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у експресији гена за IL-6 између rhEPO и Ca(OH)₂, rhEPO и НС, Ca(OH)₂ и МТА, Ca(OH)₂ и МТА+rhEPO, МТА и НС и МТА+rhEPO и НС група; б) Релативна експресија гена за GRO била је статистички значајно различита ($p < 0,05$) између rhEPO и Ca(OH)₂, МТА и МТА+rhEPO, МТА и ЕС и МТА и НС група. Разлика је била статистички значајна ($p < 0,001$) и између rhEPO и МТА група; Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean ± SD*); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест); ** статистички значајна разлика ($p < 0,001$) (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест)

Резултати релативне експресије гена за имунорегулаторне цитокине, IL-10 и TGF- β 1, у групама са директним прекривањем и експонираној контроли приказани су у Табели 7.

Табела 7. Релативна експресија гена за IL-10 и TGF- β 1 у узорцима зубне пулпе директно прекривене применом rhEPO, Ca(OH)₂, МТА или МТА+rhEPO и експонираној контроли.

Ген од интереса	Релативна експресија (mRNA)				
	(средња вредност \pm стандардна девијација)				
	rhEPO	Ca(OH) ₂	МТА	МТА+rhEPO	ЕС
IL-10	6,89 \pm 5,61 ^{*b f}	1,87 \pm 1,79	4,58 \pm 0,73 ^{*f}	2,05 \pm 2,03	3,58 \pm 2,48
TGF- β 1	12,78 \pm 14,27 ^{*b}	6,73 \pm 8,92	6,04 \pm 2,56 ^{*d}	6,73 \pm 4,62 ^{*d}	3,42 \pm 2,23

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација (*mean \pm SD*);

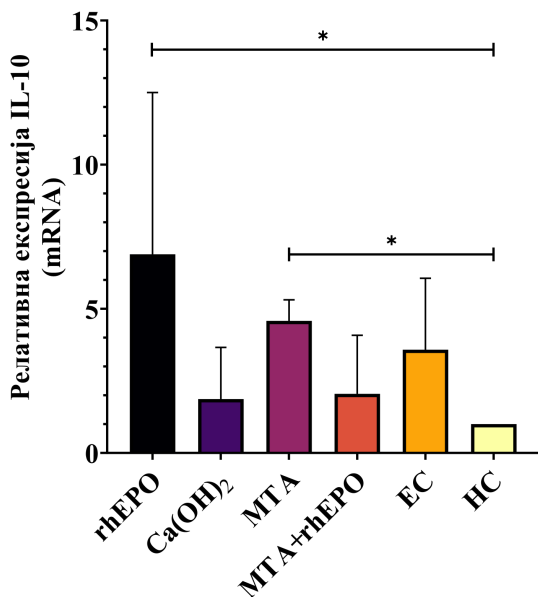
* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у односу на другу групу (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест);

** статистички значајна разлика ($p < 0,001$) у односу на другу групу (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест);

b – у односу на Ca(OH)₂; c - у односу на МТА; d – у односу на МТА+rhEPO; e – у односу на ЕС; f – у односу на НС.

Релативна експресија гена за IL-10 била је виша у односу на здраву контролу у свим групама, приказано на **Графику 6.а**, међутим, ниво статистичке значајности ($p < 0,05$) достигнут је једино поређењем са rhEPO и МТА групама. Слично, релативна експресија гена за TGF- β 1 иако је била повећана у свим групама у односу на НС групу (**График 6.б**), разлика је била статистички значајна ($p < 0,05$) само у поређењу са rhEPO, МТА и МТА+rhEPO групама.

а)



б)

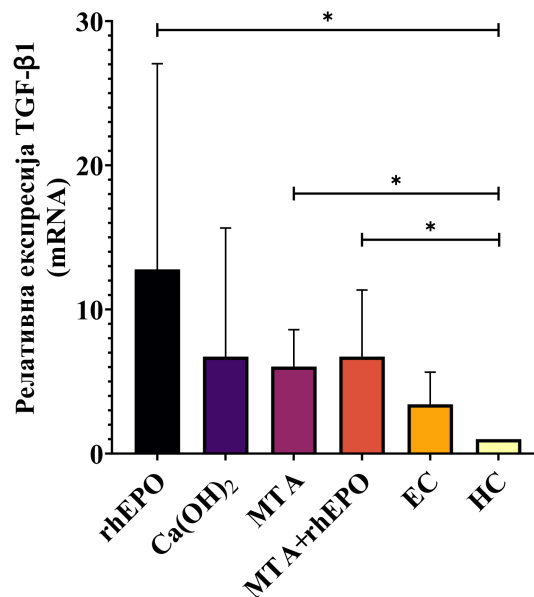


График 6. Релативна експресија гена за (а) IL-10 и (б) TGF- β 1 у зубној пулпи прекривеној применом rhEPO, Ca(OH)₂, МТА и МТА+rhEPO и експонираној контроли (ЕС) у односу на здраву контролу (НС). а) Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у експресији гена за IL-10 између rhEPO и НС и МТА и НС група; б) Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у експресији гена за TGF- β 1 између rhEPO и НС, МТА и НС и rhEPO и НС група; Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација (*mean \pm SD*); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест)

4.3.2.1 Односи релативних експресија проинфламаторних и имунорегулаторних цитокина у експонираној и директно прекривеној пулпи

У наставку, анализиран је однос експресија гена за проинфламаторне цитокине (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-6 и GRO) према имунорегулаторним цитокинима (IL-10 и TGF- β 1). Вредности односа између група са директним прекривањем пулпе и експониране контроле приказани су у **Табелама 8. и 9.** и на **Графицима 7. и 8.**

ЕС група имала је највише вредности односа у свим посматраним комбинацијама проинфламаторни цитокин/IL-10 (**Табела 8.**). Статистички значајно нижи TNF- α /IL-10 однос ($p < 0,05$) детектован је у пулпи rhEPO, МТА и МТА+rhEPO пацова у поређењу са пулпом ЕС пацова (**График 7.а**). Вредности односа IL-1 β /IL-10 и IFN- γ /IL-10 биле су статистички значајно ниже ($p < 0,05$) у свим групама са директним прекривањем (rhEPO, Ca(OH)₂ МТА и МТА+rhEPO) у односу на ЕС групу (**График 7.б и в**). Разлика у IL-6/IL-10 односу достигла је статистичку значајност једино између Ca(OH)₂ и ЕС група, док је разлика у вредностима GRO/IL-10 односа била статистички значајна поређењем МТА и МТА+rhEPO група са ЕС групом (**График 7.г и д**).

Табела 8. Анализа односа експресија гена за проинфламаторне цитокине (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-6 и GRO) у поређењу са експресијом гена за IL-10, у узорцима зубне пулпе директно прекривене применом rhEPO, Ca(OH)₂, МТА или МТА+rhEPO и експонираној контроли.

Однос	Релативна експресија (mRNA)				
	(средња вредност \pm стандардна девијација)				
	rhEPO	Ca(OH) ₂	МТА	МТА+rhEPO	ЕС
TNF- α /IL-10	0,93 \pm 1,10*	1,29 \pm 1,69	0,51 \pm 0,33*	0,36 \pm 0,40*	3,14 \pm 3,14
IL-1 β /IL-10	1,42 \pm 1,76**	2,40 \pm 4,61*	0,88 \pm 0,34**	1,17 \pm 1,17**	7,28 \pm 3,68
IFN- γ /IL-10	0,43 \pm 0,37*	0,49 \pm 0,35*	0,17 \pm 0,15*	0,62 \pm 0,19*	1,85 \pm 1,55
IL-6/IL-10	1,70 \pm 1,39	0,36 \pm 0,34*	2,79 \pm 1,27	3,96 \pm 3,40	5,88 \pm 10,65
GRO/IL-10	0,41 \pm 0,35*	0,44 \pm 0,44	0,05 \pm 0,02**	0,38 \pm 0,26*	1,50 \pm 1,10

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација (*mean \pm SD*);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у односу на ЕС групу (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест);

** статистички значајна разлика ($p < 0,001$) у односу на ЕС групу (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест);

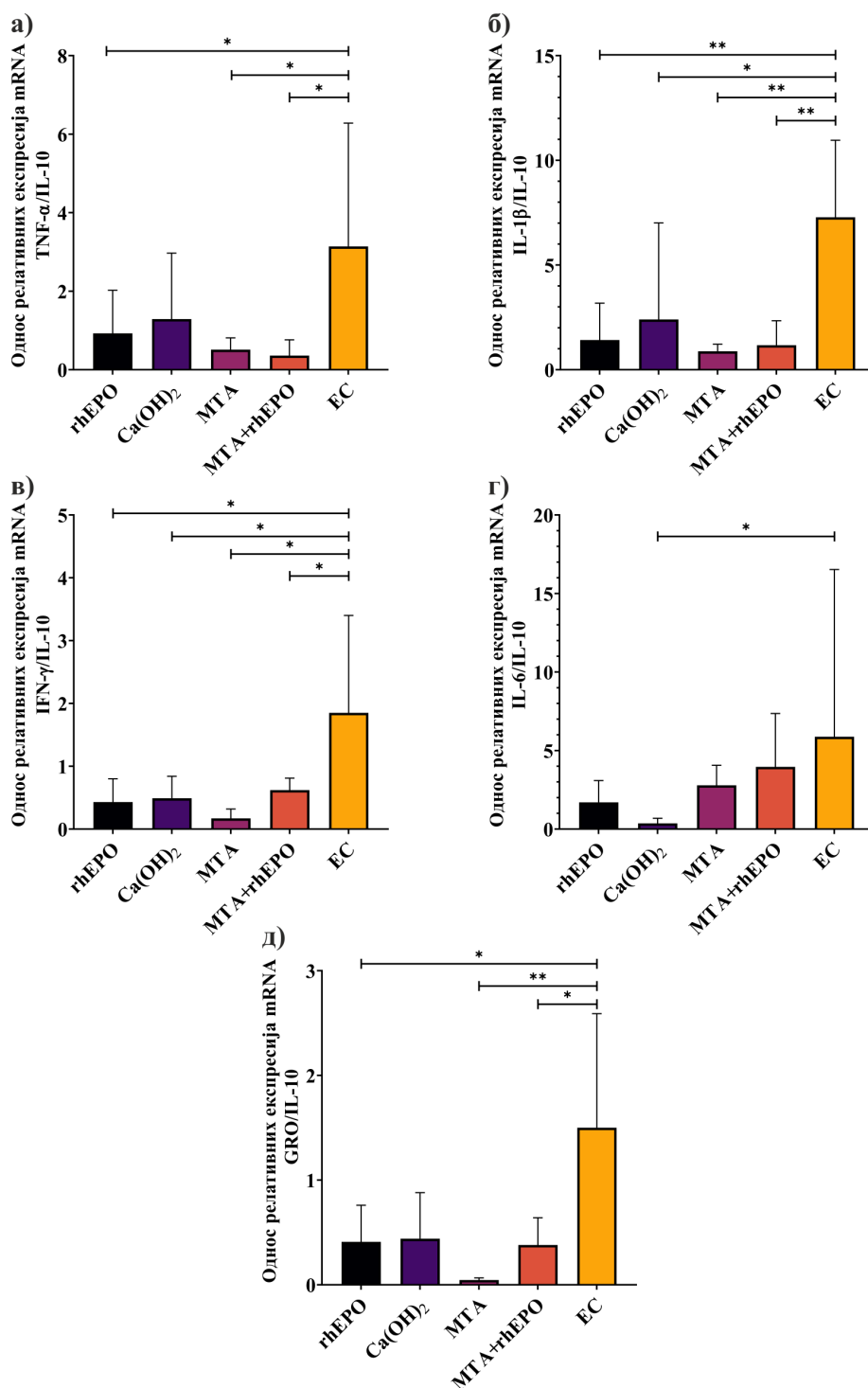


График 7. Анализа односа експресије гена за проинфламаторне цитокине (а) TNF- α , (б) IL-1 β , (в) IFN- γ , (г) IL-6, (д) GRO са експресијом гена за IL-10 у зубној пулпи прекривеној применом rhEPO, Ca(OH)₂, MTA или MTA+rhEPO и експонираној контроли (ЕС). а) Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у вредностима односа TNF- α /IL-10 између rhEPO и ЕС, MTA и ЕС и MTA+rhEPO и ЕС група; б) Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у вредностима односа IL-1 β /IL-10 између rhEPO и ЕС, Ca(OH)₂ и ЕС, MTA и ЕС и MTA+rhEPO и ЕС група; в) Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у вредностима односа IFN- γ /IL-10 између rhEPO и ЕС, Ca(OH)₂ и ЕС, MTA и ЕС и MTA+rhEPO и ЕС група; г) Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у вредностима односа IL-6/IL-10 између Ca(OH)₂ и ЕС група; д) Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у вредностима односа GRO/IL-10 између rhEPO и ЕС, MTA и ЕС и MTA+rhEPO и ЕС група; Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($mean \pm SD$); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) (Kruskal-Wallis post-hoc тест); ** статистички значајна разлика ($p < 0,001$) у односу на ЕС групу (Kruskal-Wallis post-hoc тест)

Слично као и у претходној анализи односа, ЕС група имала је највише вредности односа у свим посматраним комбинацијама проинфламаторни цитокина/TGF- β 1 (Табела 9.). Вредности односа TNF- α /TGF- β 1, IL-1 β /TGF- β 1 и IFN- γ /TGF- β 1 биле су статистички значајно ниже ($p < 0,05$) у свим групама са директним прекривањем (rhEPO, Ca(OH)₂ МТА и МТА+rhEPO) у односу на ЕС групу (График 8.а, б и в). Разлике вредности IL-6/TGF- β 1 односа достигле су статистичку значајност једино поређењем Ca(OH)₂ и ЕС групе, док је вредност GRO/TGF- β 1 односа била статистички значајна једино поређењем МТА и ЕС групе (График 8.г и д).

Табела 9. Анализа односа експресија гена за проинфламаторне цитокине (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-6 и GRO) у поређењу са експресијом гена за TGF- β 1 у узорцима зубне пулпе директно прекривене применом rhEPO, Ca(OH)₂, МТА или МТА+rhEPO и експонираној контроли.

Однос	Релативна експресија (mRNA)				
	(средња вредност \pm стандардна девијација)				
	rhEPO	Ca(OH) ₂	МТА	МТА+rhEPO	ЕС
TNF- α /TGF- β 1	0,33 \pm 0,27*	1,06 \pm 1,15*	0,51 \pm 0,45*	0,24 \pm 0,29**	11,65 \pm 13,02
IL-1 β /TGF- β 1	1,02 \pm 0,89*	1,13 \pm 1,10*	0,79 \pm 0,44*	0,63 \pm 0,85*	28,46 \pm 38,14
IFN- γ /TGF- β 1	0,73 \pm 0,77*	0,62 \pm 1,05*	0,12 \pm 0,19*	0,42 \pm 0,26*	4,37 \pm 4,78
IL-6/TGF- β 1	2,20 \pm 2,81	0,65 \pm 1,14*	2,61 \pm 2,14	2,95 \pm 2,29	6,21 \pm 6,35
GRO/TGF- β 1	0,36 \pm 0,36	0,54 \pm 1,07	0,04 \pm 0,03*	0,23 \pm 0,15	0,66 \pm 0,69

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација (*mean* \pm *SD*);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у односу на ЕС групу (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест);

** статистички значајна разлика ($p < 0,001$) у односу на ЕС групу (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест);

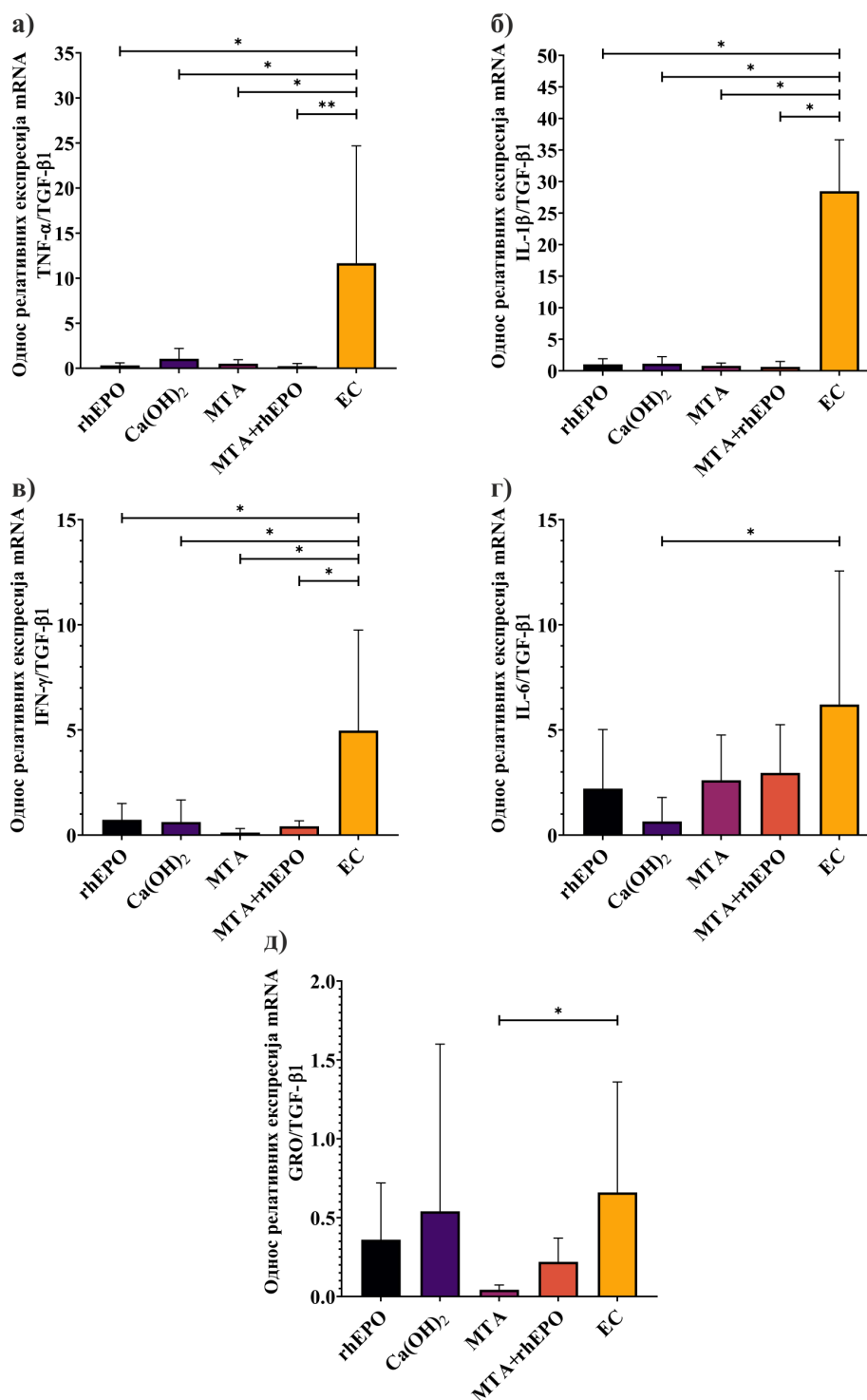


График 8. Анализа односа експресије гена за проинфламаторне цитокине (а) TNF- α , (б) IL-1 β , (в) IFN- γ , (г) IL-6, (д) GRO са експресијом гена за TGF- β 1 у зубној пулпи прекривеној применом rhEPO, Ca(OH)₂, MTA и MTA+rhEPO и експонираној контроли (ЕС). а) Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у вредностима односа TNF- α /TGF- β 1 између rhEPO и ЕС, Ca(OH)₂ и ЕС, MTA и ЕС и MTA+rhEPO и ЕС група; б) Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у вредностима односа IL-1 β /TGF- β 1 између rhEPO и ЕС, Ca(OH)₂ и ЕС, MTA и ЕС и MTA+rhEPO и ЕС група; в) Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у вредностима односа IFN- γ /TGF- β 1 између rhEPO и ЕС, Ca(OH)₂ и ЕС, MTA и ЕС и MTA+rhEPO и ЕС група; г) Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у вредностима односа IL-6/TGF- β 1 између Ca(OH)₂ и ЕС група; д) Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у вредностима односа GRO/TGF- β 1 између MTA и ЕС група; Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($mean \pm SD$); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) (Kruskal-Wallis post-hoc тест); ** статистички значајна разлика ($p < 0,001$) у односу на ЕС групу (Kruskal-Wallis post-hoc тест)

4.3.3 Ткивна експресија маркера одонтобластне активности у експонираној и директно прекривеној пулпи

Како би показали ефекте директног прекривања пулпе применом rhEPO и МТА+rhEPO на дентиногенезу, испитивали смо промене нивоа релативне експресије гена за маркере одонтобластне активности (ALP, OCN, DSPP и DMP-1). Вредности ткивне експресије у зубној пулпи НС групе узете су као референтне вредности (вредности НС приказана као 1) (**График 9.**). Резултати релативне експресије гена за маркере одонтобластне активности у групама са директним прекривањем и експонираној контроли приказани су у **Табели 10.**

Табела 10. Релативна експресија гена за ALP, OCN, DSPP и DMP-1 у узорцима зубне пулпе директно прекривене применом rhEPO, Ca(OH)₂, МТА или МТА+rhEPO и експонираној контроли.

Ген од интереса	Релативна експресија (mRNA)				
	(средња вредност ± стандардна девијација)				
	rhEPO	Ca(OH) ₂	МТА	МТА+rhEPO	ЕС
ALP	3,29±1,60	2,86±1,08*	6,25±3,25	2,55±0,96	1,82±0,82*
OCN	1,99±1,79	0,88±0,52	0,77±0,31	1,50±0,85	0,57±0,25
DSPP	1,07±0,73	1,28±0,96	1,21±0,53	1,05±0,83	0,73±0,70
DMP-1	1,86±0,77	1,63±0,62	1,51±0,42	1,90±0,64	0,84±0,67

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean ± SD*);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у односу на другу групу (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест);

** статистички значајна разлика ($p < 0,001$) у односу на другу групу (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест);

b – у односу на Ca(OH)₂; c - у односу на МТА; d – у односу на МТА+rhEPO; e – у односу на ЕС; f – у односу на НС.

Релативна експресија гена за ALP била је статистички значајно виша ($p < 0,05$) у узорцима директно прекривене пулпе применом rhEPO, Ca(OH)₂, МТА и МТА+rhEPO у односу на пулпу НС групе (**График 9.а**). МТА група показала је највишу вредност релативне експресије гена за ALP која је била статистички значајно виша ($p < 0,05$) у односу на ЕС групу (**График 9.а**). Просечна вредност релативне експресије гена за OCN била је увећана у односу на НС групу само у узорцима зубне пулпе директно прекривене применом rhEPO и МТА+rhEPO што је и приказано на **Графику 9.б**, међутим, добијена разлика нема статистичку значајност ($p > 0,05$). Статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у експресији гена за OCN уочена је само поређењем МТА+rhEPO и ЕС група (**График 9.б**). **График 9.в** приказује промену релативне експресије гена за DSPP у односу на НС групу. Иако није било статистички значајне разлике ($p > 0,05$) међу групама, уочава се да су просечне вредности више у Ca(OH)₂, МТА и МТА+rhEPO групама у односу на НС групу, док rhEPO и ЕС група показују ниже вредности (**График 9.в**). Просечне вредности релативне експресије гена за DMP-1 биле су увећане у узорцима директно прекривене пулпе, док су вредности у ЕС групи биле ниже у односу на НС групу (**График 9.г**). Међутим, статистички значајна разлика ($p < 0,05$) једино је детектована поређењем МТА+rhEPO са ЕС и НС групама (**График 9.г**).

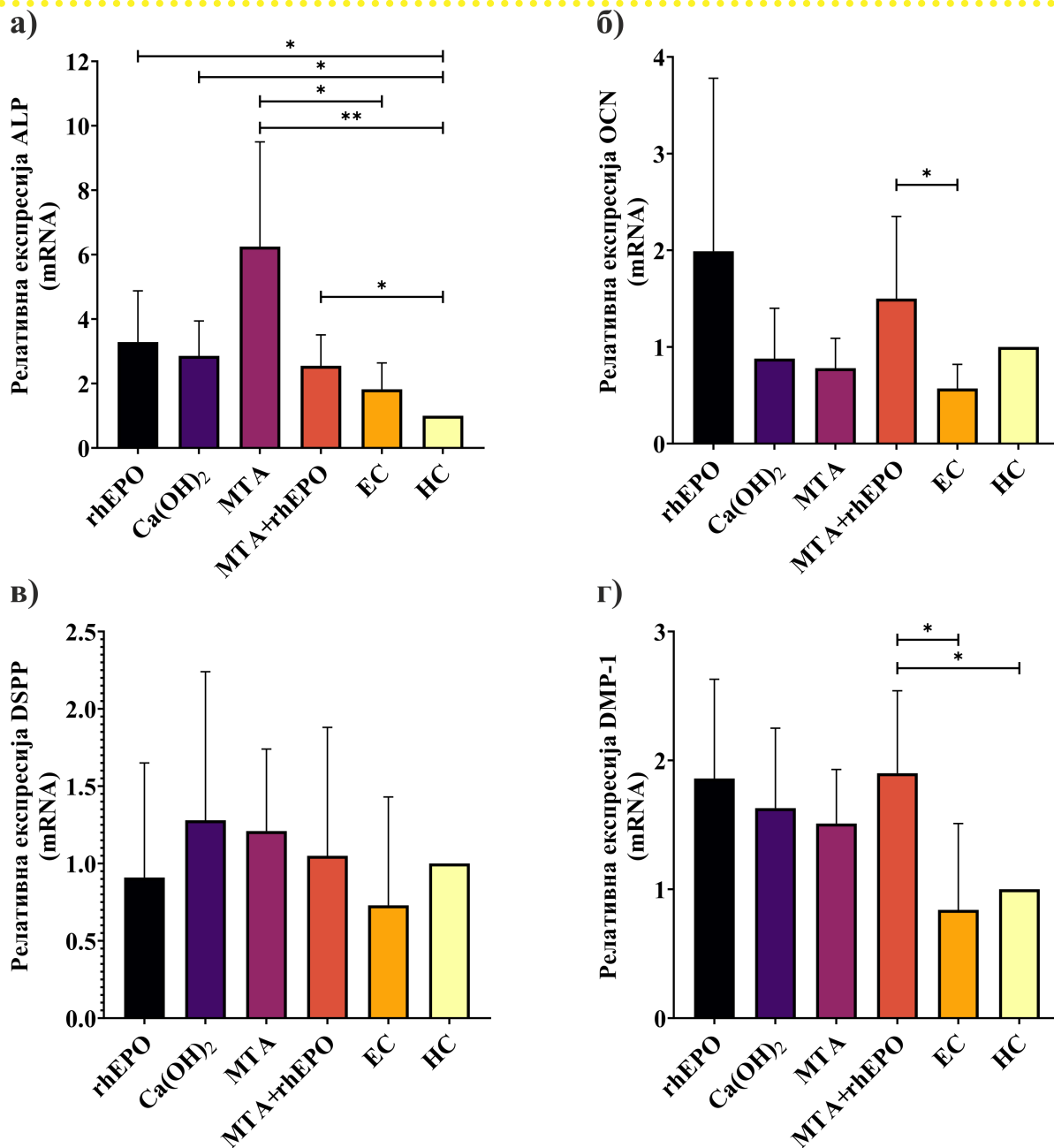


График 9. Релативна експресија гена за (а) ALP, (б) OCN, (в) DSPP и (г) DMP-1 у зубној пулпи прекривеној применом rhEPO, Ca(OH)₂, MTA и MTA+rhEPO и експонираној контроли (EC) у односу на здраву контролу (HC). а) Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у експресији гена за ALP између rhEPO и HC, Ca(OH)₂ и HC, MTA и EC, MTA+rhEPO и HC група. Разлика у релативној експресији била је статистички значајна ($p < 0,001$) и између MTA и HC група; б) Релативна експресија гена за OCN била је статистички значајно различита ($p < 0,05$) једино између MTA+rhEPO и EC група; в) Релативна експресија гена за DSPP није показала статистички значајне разлике ($p > 0,05$) међу групама; г) Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у експресији гена за DMP-1 између MTA+rhEPO и EC и MTA+rhEPO и HC група; Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($mean \pm SD$); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) (Kruskal-Wallis post-hoc тест); ** статистички значајна разлика ($p < 0,001$) (Kruskal-Wallis post-hoc тест)

4.3.4 АНАЛИЗА ЕФЕКТА ЕКСПОНИРАЊА И ДИРЕКТНОГ ПРЕКРИВАЊА ЗУБНЕ ПУЛПЕ НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА

4.3.5 Утицај експонирања и директног прекривања зубне пулпе на прооксидативне параметре у узорцима крви

Да би испитали ефекте директног прекривања пулпе применом rhEPO и MTA+rhEPO на системске параметре оксидативног стреса, одређене су вредности прооксидативних параметара (TBARS, NO₂⁻, O₂⁻ и H₂O₂⁻) биохемијским анализама узорака крви експерименталних животиња. Вредности rhEPO и MTA+rhEPO група су упоређене са Ca(OH)₂, MTA, ЕС и НС групама (**График 10.**). Резултати анализе прооксидативних параметара у групама са директним прекривањем, експонираној контроли и здравој контроли приказани су у **Табели 11.**

Табела 11. Ефекти експонирања и директног прекривања зубне пулпе применом rhEPO, Ca(OH)₂, MTA или MTA+rhEPO на вредности прооксидативних параметара у системској циркулацији.

Вредности прооксидативних параметра по групама (средња вредност ± стандардна девијација)						
	rhEPO	Ca(OH) ₂	MTA	MTA+rhEPO	ЕС	НС
TBARS (nmol/ml)	1,27±0,16	1,20±0,09 *f	1,09±0,08 *d **f	1,38±0,15	2,14±1,05 *f	1,50±0,07
NO₂⁻ (nmol/ml)	3,07±0,42	2,48±0,63 **e *f	2,71±0,40 **e *f	2,62±0,37 **e *f	3,35±0,07	3,28±0,02
O₂⁻ (nmol/ml)	1,53±0,98 *e	0,97±0,29 *e	0,73±0,26 *d e f	1,56±0,31 *e	2,94±0,44 *f	1,34±0,35
H₂O₂⁻ (nmol/ml)	3,74±0,18 *c	3,67±0,56 *c	2,78±0,14 **f	3,28±0,39 *f	3,55±0,25	3,93±0,28

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean* ± SD);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у односу на другу групу (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест);

** статистички значајна разлика ($p < 0,001$) у односу на другу групу (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест);

b – у односу на Ca(OH)₂; c – у односу на MTA; d – у односу на MTA+rhEPO; e – у односу на ЕС; f – у односу на НС.

Вредност индекса липидне пероксидације, мерен као TBARS, била је највиша у ЕС групи, док је у осталим групама била приближна здравој контроли (НС) (**Слика X.a**). Статистички значајна разлика постојала је између Ca(OH)₂ и НС група ($p < 0,05$), MTA и НС група ($p < 0,001$), као и између MTA и MTA+rhEPO и ЕС и НС група ($p < 0,05$) (**График 10.a**). Узорци из rhEPO групе показали су вредност NO₂⁻ које нису биле статистички значајно различите ($p > 0,05$) у односу на остале групе. С друге стране, Ca(OH)₂, MTA и MTA+rhEPO групе показале су статистички значајно ниже вредности NO₂⁻ у односу на ЕС групу ($p < 0,001$) и НС групу ($p < 0,05$) (**График 10.б**). Највишу вредност O₂⁻ показала је ЕС група. Вредност у овој групи била је статистички значајно виша ($p < 0,05$) у односу на rhEPO, Ca(OH)₂, MTA, MTA+rhEPO и НС групе (**График 10.в**). Вредност H₂O₂⁻ НС групе, није се статистички разликовала у односу на ЕС, rhEPO и Ca(OH)₂ групе, али је била статистички значајно виша у односу на MTA групу ($p < 0,001$) и MTA+rhEPO групу ($p < 0,05$) (**График 10.г**).

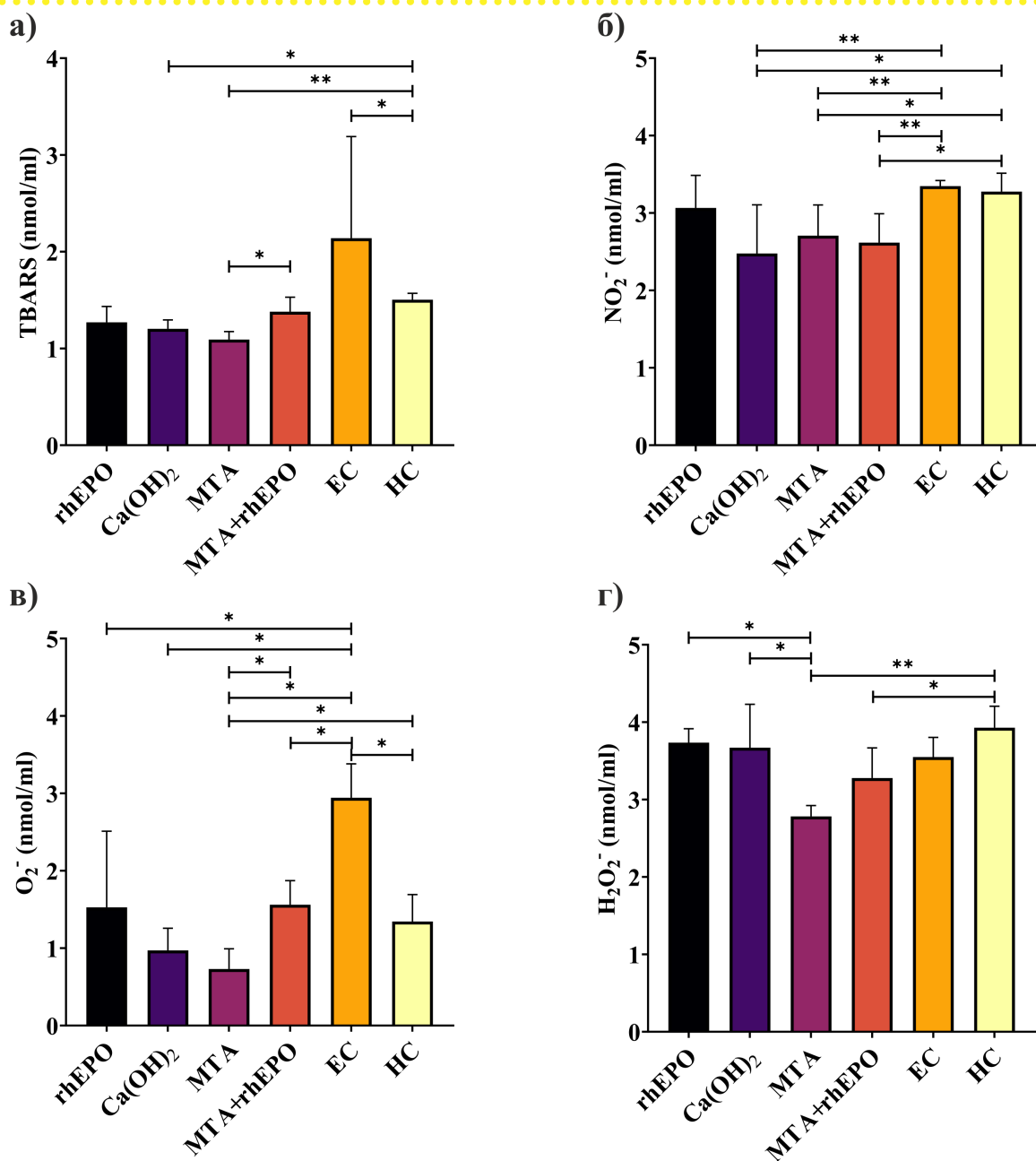


График 10. Вредности прооксидативних параметара, (а) TBARS, (б) NO₂⁻, (в) O₂⁻ и (г) H₂O₂⁻, у узорцима крви rhEPO, Ca(OH)₂, MTA и MTA+rhEPO, EC и HC група. а) Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у вредностима TBARS између MTA и MTA+rhEPO и EC и HC група, као и између MTA и HC група ($p < 0,001$); б) Вредности NO₂⁻ у Ca(OH)₂, MTA и MTA+rhEPO групама биле су статистички значајно различите у односу на EC групу ($p < 0,001$) и HC групу ($p < 0,05$); в) Вредности O₂⁻ у rhEPO, Ca(OH)₂, MTA и MTA+rhEPO групама биле су статистички значајно различите у односу на EC групу ($p < 0,05$). Вредности EC групе статистички значајно се разликовала ($p < 0,05$) од HC групе, док је вредност MTA групе била значајно различита ($p < 0,05$) од MTA+rhEPO и HC група; г) MTA група показала је статистички значајну разлику у вредности H₂O₂⁻ у односу на rhEPO и Ca(OH)₂ групе ($p < 0,05$) и HC групу ($p < 0,001$). Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) између MTA+rhEPO и HC група; Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($mean \pm SD$); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) (Kruskal-Wallis post-hoc тест); ** статистички значајна разлика ($p < 0,001$) (Kruskal-Wallis post-hoc тест)

4.3.6 Утицај експонирања и директног прекривања зубне пулпе на антиоксидативне параметре у узорцима крви

Поред прооксидативних, одређене су вредности антиоксидативних параметара (CAT, SOD и GSH) како би се додатно испитали ефекти директног прекривања пулпе применом rhEPO и МТА+rhEPO на параметре оксидативног стреса. Вредности rhEPO и МТА+rhEPO група су упоређене са Ca(OH)₂, МТА, ЕС и НС групама (**График 11.**). Резултати анализе антиоксидативних параметара у групама са директним прекривањем, експонираној контроли и здравој контроли приказани су у **Табели 12.**

Табела 12. Ефекти директног прекривања зубне пулпе применом rhEPO, Ca(OH)₂, МТА или МТА+rhEPO на вредности антиоксидативних параметара у системској циркулацији.

Вредности антиоксидативних параметра по групама (средња вредност ± стандардна девијација)						
	rhEPO	Ca(OH) ₂	МТА	МТА+rhEPO	ЕС	НС
CAT (U/gHb×10 ³)	35,17±14,72 *b e	82,76±20,88 *f	54,53±22,65	56,22±36,46	90,71±50,52 *f	31,53±3,24
SOD (U/gHb×10 ³)	109,47±18,15 #f	104,46±42,84 #f	78,41±39,43 ##f	133,08±84,54 #e	68,88±42,61 ##f	189,51±29,54
GSH (nmol/ml)	72970,17 ±3398,06 *e	80096,34 ±3836,21 *c **e	58152,55 ±7378,97 *d	81268,08 ±6231,39 *e	44457,35 ±7844,10 *f	72630,90 ±9845,15

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean ± SD*);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у односу на другу групу (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест);

** статистички значајна разлика ($p < 0,001$) у односу на другу групу (*Kruskal-Wallis post-hoc* тест);

статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у односу на другу групу (*Oneway ANOVA/Turkey post-hoc* тест);

статистички значајна разлика ($p < 0,001$) у односу на другу групу (*Oneway ANOVA/Turkey post-hoc* тест);

b – у односу на Ca(OH)₂; c – у односу на МТА; d – у односу на МТА+rhEPO; e – у односу на ЕС; f – у односу на НС.

Вредности CAT биле су више у свим групама у односу на НС групу, међутим статистички значајна разлика ($p < 0,05$) постојала је између rhEPO и Ca(OH)₂, rhEPO и ЕС, Ca(OH)₂ и НС и ЕС и НС група (**График 11.а**). ЕС група показала је значајно нижу ($p < 0,001$) вредност SOD у односу на НС групу, као и МТА група, али и rhEPO и Ca(OH)₂ групе ($p < 0,05$). С друге стране, једино је МТА+rhEPO група показала статистички значајно вишу ($p < 0,05$) вредност SOD у односу на ЕС групу и непостојање разлике у односу на НС групу ($p > 0,05$) (**График 11.б**). ЕС група такође је показала значајно нижу ($p < 0,05$) вредност GSH у односу на НС групу. Ни једна од група са директним прекривањем није показала статистички значајну разлику ($p > 0,05$) са НС групом, док су у односу на ЕС групу, статистички значајно вишу вредност ($p < 0,05$) показале rhEPO, Ca(OH)₂, и МТА+rhEPO групе (**График 11.в**).

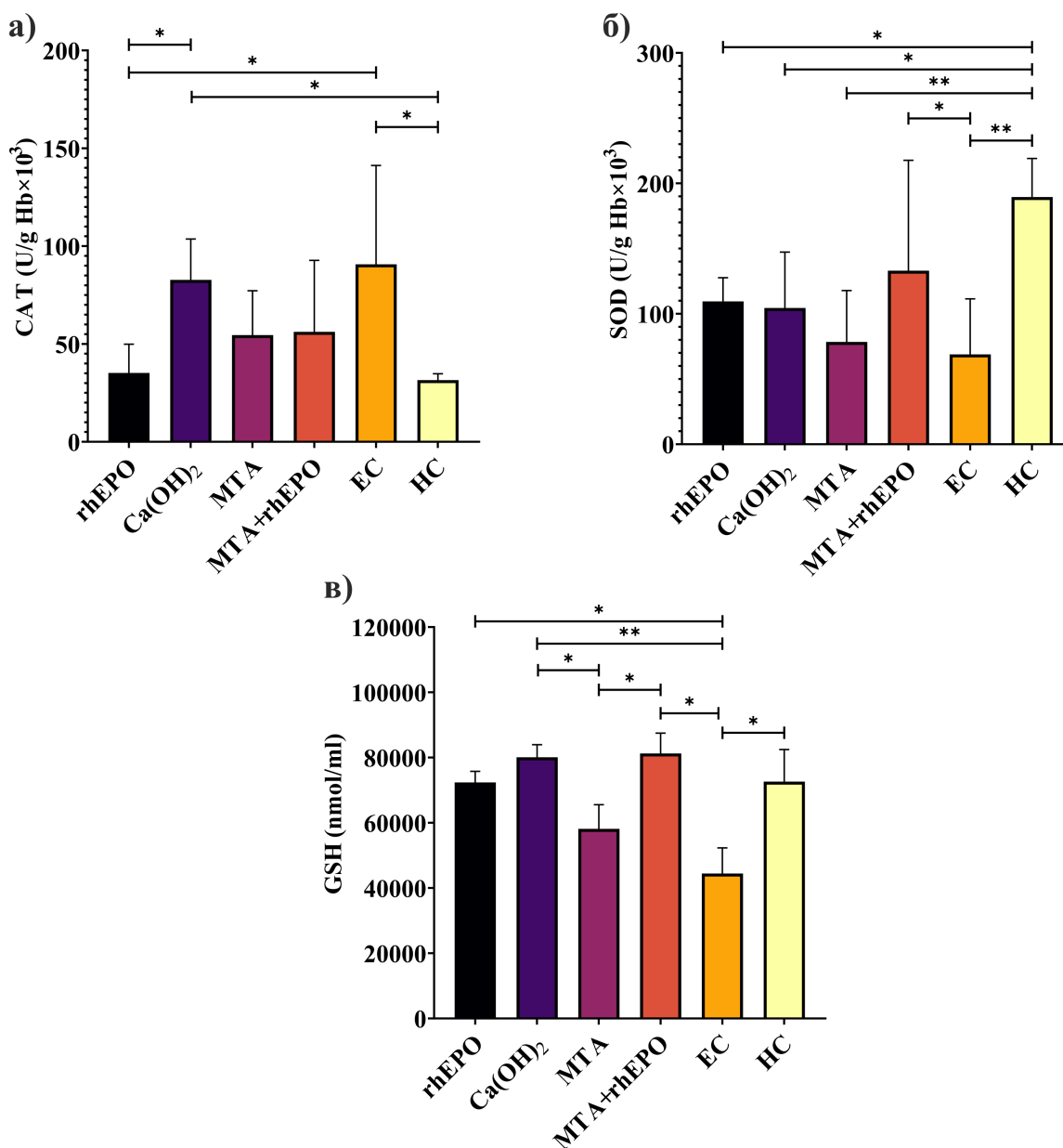


График 11. Вредности антиоксидативних параметара, (а) CAT, (б) SOD и (в) GSH, у узорцима крви rhEPO, Ca(OH)₂, MTA и MTA+rhEPO, EC и HC група. а) Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у вредностима CAT између rhEPO и Ca(OH)₂, rhEPO и EC, Ca(OH)₂ и HC и EC и HC група; б) Вредности SOD у HC групи била је статистички значајно виша у односу на rhEPO и Ca(OH)₂ групе ($p < 0,05$), као и MTA и EC групе ($p < 0,001$). rhEPO група није показала разлику у односу на HC ($p > 0,05$), али јесте у односу на EC групу где је вредност била статистички значајно виша ($p < 0,001$); в) MTA група показала је статистички значајно ниже ($p < 0,05$) вредности GSH у односу на Ca(OH)₂ и MTA+rhEPO групе. rhEPO, Ca(OH)₂ и MTA+rhEPO, али и HC група, показале су статистички значајно више вредности у односу на EC групу; Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (mean ± SD); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) (Kruskal-Wallis post-hoc тест за CAT и GSH, Oneway ANOVA/Turkey post-hoc тест за SOD); ** статистички значајна разлика ($p < 0,001$) (Kruskal-Wallis post-hoc тест за CAT и GSH, Oneway ANOVA/Turkey post-hoc тест за SOD)

5. ДИСКУСИЈА



5. ДИСКУСИЈА

Овим истраживањем по први пут је показана експресија ЕРО-R и ендогеног ЕРО у ћелијама експониране и директно прекривене пулпе пацова. Захваљујући својим плеиотропним својствима, а и постојању експресије ЕРО-R у различитим типовима ћелија, укључујући и ћелије зубне пулпе, ЕРО представља важан фактор у инфламаторним и репараторним процесима након повреда различитих ткива (189,199). Такође, ово је прво истраживање терапијских ефеката егзогеног rhЕРО у директном прекривању зубне пулпе. Слично као и у другим ткивима која су до сада истраживана, rhЕРО је показао значајне позитивне ефекте на смањење инфламације која се огледала у регулацији проинфламаторних и имунорегулаторних цитокина, промоцији антиоксидативних механизма, а значајно у терапији зубне пулпе, подстицао је процесе минерализације који су важан фактор успеха директног прекривања зубне пулпе (189,222,223).

5.1 Експресија ЕРО и ЕРО-R у ткиву зубне пулпе

ЕРО је примарно експримиран у бубрежном ткиву, а затим у јетри у значајно мањој количини, а одакле се дистрибуира путем крвотока и делује удаљено на хематопоетске ћелије костне сржи. Међутим, експресија ЕРО показана је и у ћелијама мозга, плућа, тестиса и плаценте где може деловати локално, а најчешће у одговору на повреду или оштећење ткива (178,205). Додатни показатељ вишеструких улога ЕРО, је показано присуство његовог рецептора, ЕРО-R, у различитим ткивима, а још важније на ендотелним ћелијама крвних судова и имунским ћелијама (188,189).

Једина сазнања о експресији ЕРО и ЕРО-R у зубној пулпи долазе из истраживања *Gong* и сар. (8) који су посматрали њихово присуство у здравој и инфламираној хуманој пулпи. Показали су да је експресија ЕРО протеина и гена за ЕРО била значајно виша у узорцима инфламиране пулпе, док у здравој пулпи овај протеин није био присутан или је био веома благо експримиран. У инфламираној пулпи, ЕРО је био најприсутнији у зонама инфламаторног инфилтратата, указујући на његову активност у инфламаторним процесима зубне пулпе. С друге стране, експресија ЕРО-R уочена је и у здравој и инфламираној пулпи, а анализа експресија гена није показала разлику између ове две групе. У здравој пулпи присуство ЕРО-R протеина било је најизраженије у одонтобластном слоју, што говори у прилог могућности да овај рецептор регулише формативну активност зубне пулпе (8). У нашем истраживању, дистрибуција експресија ЕРО и ЕРО-R протеина у ткиву пулпе била је слична резултатима студије *Gong* и сар. (8); највиша експресија била је присутна у зони одонтобласта и инфламаторном инфилтрату (**Слика 1.**). Међутим, нивои експресије били су различити у здравој и инфламираној (експонираној) пулпи, а што је додатно потврђено qRT-PCR анализом. Експресија гена за ЕРО била је виша у здравој, док је ген за ЕРО-R био значајно више експримиран у експонираној групи (**Табела 4.** и **Графици 2. и 3.**). Могући разлог ове разлике је степен инфламације посматраног узорка, јер је показано да у инфламираном ткиву долази до смањења експресије ендогеног ЕРО, што је био случај у нашем истраживању (9). Такође, *in vitro* на културама астроцита и ћелија хуманог хепатома, показано је да проинфламаторни цитокини, IL-1 и TNF- α , умањују експресију и продукцију ЕРО у овим ћелијама путем GATA2 и NF- κ B (енг. *nuclear factor-kappa B*) механизма (224–226). С друге стране, резултати других аутора показали су да експресија ЕРО-R у инфламираном ткиву често бива непромењена или долази до њеног повећања, што је у сагласности са резултатима

наше студије (9). Разлог повећања експресије ЕРО-R може бити одговор ћелија на локални или системски недостатак ЕРО (227).

Резултати нашег истраживања показали су присуство ЕРО и ЕРО-R у ткиву пулпе након директног прекривања. У доступној литератури, недостају резултати других аутора са којима би овај наш резултат био упоредив. Имунохистохемијска анализа показала је присуство ЕРО и ЕРО-R протеина у узорцима зубне пулпе прекривене Са(ОН)₂ и МТА (**Слика 1.**). Експресија ЕРО протеина била је статистички значајно виша ($p < 0,05$) у групама са директним прекривањем пулпе у односу на експонирану. Иако није било статистички значајне разлике ($p > 0,05$) експресија ЕРО-R била је незнатно виша у Са(ОН)₂ и МТА групама у односу на здраву контролу (**Слика 1.**). Међутим, експресија гена за ЕРО била је статистички значајно виша ($p < 0,05$) у Са(ОН)₂ и МТА групама него у експонираној и здравој контроли (**Табела 4.** и **Графици 2. и 3.**). Експресија гена за ЕРО регулисана је HIF-1 транскрипционим фактором (176). У нормоксичним условима, HIF-1 је неактиван због интеракције са, између осталог, пролил хидроксилазом (173). Низак ниво кисеоника инхибира пролил хидроксилазу, омогућавајући активирање HIF-1 (228). Хипоксија се сматра важним фактором у регенеративним процесима у пулпи. Услед вазодилатације и екстравазације у акутном инфламаторном одговору, а услед повећаног притиска интерстицијалне течности, поједине зоне пулпе постају исхемичне. Услед присутне хипоксије у исхемичним зонама долази до стимулације HIF-1 транскрипционог фактора (228,229). У студији *Zhao* и сар. (230), показана је значајна експресија HIF-1 на мишијем моделу експонирања пулпе, за разлику од здраве пулпе. *In vitro* је показано да DPSC могу да експримирају HIF-1 (231). Експресија VEGF се такође одиграва HIF-1 зависним механизмом, а експримирани VEGF, као и ЕРО, може да стимулише ангиогенезу и успостављање крвотока у исхемичном пулпном ткиву (228,231). Према резултатима нашег истраживања, експресија гена за ЕРО била је значајно различита ($p < 0,05$) између пулпних ткива прекривених Са(ОН)₂ или МТА, где је МТА група показала значајно вишу експресију (**Табела 4.** и **График 2.**). Утицај МТА на експресију ЕРО у зубној пулпи до сада није испитиван, али је претходним студијама других аутора показано да МТА стимулише експресију VEGF у хуманим ћелијама зубне пулпе (122).

ЕРО-R је такође био експримиран у пулпном ткиву директно прекривеном применом Са(ОН)₂ или МТА (**График 3.**), али је ниво експресије био незнатно виши у односу на здраву контролу показано и имунохистохемијском и qRT-PCR методом ($p > 0,05$). Значајно нижа експресија гена за ЕРО-R постојала је у односу на експонирану контролну групу (**Табела 4.** и **График 3.**). Велика распрострањеност ЕРО-R у различитим ћелијама организма омогућава плеиотропне функције ЕРО (200). ЕРО-R може бити експримиран на мембранама различитих ћелија као хомодимер ((ЕРО-R)₂) или хетеродимер са β CR рецептором чинећи ткивно-заштитни рецептор (TRP) (189). TRP је у повређеном ткиву највише експримиран на имунским ћелијама, а везивањем за овај рецептор ЕРО остварује различите ефекте који промовишу зарастање ткива укључујући антиинфламаторно дејство, промоцију ангиогенезе и васкуларизације, промоцију миграције и диференцијације мезенхималних матичних ћелија између осталог (200,201). Показано је да почетни инфламаторни одговор стимулише експресију TRP, међутим експресивна продукција проинфламаторних цитокина умањује локалну продукцију ЕРО, онемогућавајући позитивне ефекте његове интеракције са TRP (200). Превазилажење проблема недостатка ЕРО могуће је додавањем егзогеног ЕРО у повређено ткиво што је до сада истраживано у различитим моделима болести (10,188,189,206–212). Примена егзогеног rhЕРО у терапији директним прекривањем пулпе представљало је још један од експерименталних задатака нашег истраживања, а

процењени су и ефекти rhЕРО на параметре инфламације и минерализације зубне пулпе.

5.2 Ефекти препарата који су садржали rhЕРО на параметре инфламације зубне пулпе

Најчешћи разлог експонирања пулпе су каријес и траума, а експонирање кроз дубоки каријес често доводи до бактеријске контаминације пулпног ткива и последичне инфламације (116). Директно прекривање пулпе експониране приликом уклањања каријеса повезано је са нижим стопама успеха терапије у односу на трауматску експозицију (4). У клиничким условима, стање пулпе може да се процени једино на основу субјективних симптома и клиничких тестова, а показано је да се клиничка слика и хистопатолошки налаз често не подударају; у случајевима иреверзибилних запаљења, постављена дијагноза и хистопатолошки налаз подударају се у око 84% (232). У нашем истраживању, коришћен је модел реверзибилно инфламиране зубне пулпе пацова како би се испитао ефекат уобичајено коришћених материјала и rhЕРО у стању пулпе које се често среће у клиничкој пракси. Овај модел је и претходно коришћен како би се испитали антиинфламаторни ефекти материјала у директном прекривању (5,163,164).

Директно прекривање пулпе уобичајено се спроводи постављањем калцијум хидроксида или МТА на експонирану здраву зубну пулпу или у стању реверзибилне инфламације уз поштовање правила асептичног рада (2). Без обзира на употребљени материјал, формирање репараторног дентинског моста настаје реакцијом зубне пулпе на хемијски надражај. Услед високог рН, материјал за директно прекривање изазива повреду пулпног ткива изазивајући површинску некрозу, стимулишући благу инфламацију и репараторне процесе у пулпи (123). Разлог неуспеха може бити непредвидив степен постојећег инфламаторног процеса у зубној пулпи у којој каустични материјали могу додатно да повећају инфламацију. Уједно, процеси који се одигравају у репаративној дентиногенези као одговор на материјале, не осликавају уобичајене формативне процесе у зубној пулпи. Из тих разлога, спроведена су бројна истраживања утицаја других једињења са антиинфламаторним и регенеративним својствима на инфламацију и репаративну дентиногенезу у директном прекривању пулпе, а са циљем да замене и побољшају карактеристике потенцијално каустичних калцијум хидроксида и МТА (74).

Након експонирања, у зубној пулпи активира се акутни инфламаторни одговор који може да се заустави правовременим директним прекривањем пулпе (33). Међутим, у случају изостанка терапије или прекривањем инфламиране пулпе инертним материјалима, антиинфламаторни и репараторни ефекти директног прекривања изостају, водећи у наставак запаљеног процеса и некрозе (5). Такав исход показан је у нашем истраживању у експонираној контроли (**Слика 2.в и г**). Након 28 дана од затварања кавитета, сви узорци експониране контроле показали су изразиту инфламацију и некрозу круничне пулпе. Један узорак показао је благу минерализацију у зони експонирања, али без формирања потпуног дентинског моста. Ова минерализација може бити последица реакције пулпног ткива у почетним фазама инфламације, јер је блага инфламација пулпе показана као стимулаторни фактор за минерализациону активност пулпног ткива, на чему се и заснива терапија директним прекривањем (48).

У нашем истраживању по први пут показана је могућност примене rhЕРО у директном прекривању пулпе. Хистолошка анализа показала је да примена rhЕРО након 28 дана од директног прекривања најчешће даје слику умерене до средње инфламационе пулпе (**Слика 2.д и ђ**), слично Ca(OH)₂ групи (**Слика 2.е и ж**), а комбинација МТА+rhЕРО показала је још повољнији хистолошки налаз потпуног одсуства инфламације (**Слика 2.ј и к**), који је сличан узорцима у МТА групи (**Слика 2.з и и**). Квантификација хистолошких резултата показала је да су узорци зубне пулпе прекривене применом rhЕРО или комбинације МТА+rhЕРО имали значајно ($p < 0,05$) мањи степен инфламације у односу на експонирану контролу. Није било статистички значајне разлике у степену инфламације између rhЕРО, МТА+rhЕРО, Ca(OH)₂ и МТА (**Табела 3. и График 1.а**). Ови резултати су у сагласности са претходним хистолошким испитивањима ефеката rhЕРО у другим ткивима, где је показано умањење инфламације у оралном мукозитису, колитису и исхемичној повреди коже (207,217,233).

Експонирање пулпе узрокује локално оштећење површинског слоја одонтобласта, због чега је потребно да они буду замењени ћелијама сличним одонтобластима које ће преузети њихову формативну улогу (33). Ови процеси праћени су молекуларним механизмима регулисаним проинфламаторним и имунорегулаторним цитокинима, а на основу одређивања њихове експресије добија се додатни увид у терапијске ефекте материјала у директном прекривању (35). Блага инфламација као последица експонирања и директног прекривања пулпе праћена синтезом проинфламаторних и имунорегулаторних цитокина и активацијом имунских ћелија, сматра се основом за отпочињање репараторних процеса (48). Међутим, неконтролисана продукција цитокина и активирање имунских ћелија доводи до иреверзибилних оштећења и некрозе зубне пулпе (228). Показано је да ниске концентрације проинфламаторних цитокина TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-6 и IL-8 могу да стимулишу процесе повезане са репарацијом пулпног ткива, док је у случају њихове повећане експресије изражен супротан ефекат (34,35,55,56,60–63,68).

Резултати претходних истраживања показали су да у случају реверзибилних и иреверзибилних запаљења пулпе, али и у случају експонирања пулпе кроз каријесни дентин, долази до значајног повећања експресије TNF- α , IL-1 β и IFN- γ у односу на здраву контролу (62,88,234), што је у сагласности са резултатима нашег истраживања (**Табела 5. и График 4.**). За разлику од наших, резултати претходних студија других аутора показали су и повећање проинфламаторних IL-6 и IL-8, али и имунорегулаторног IL-10 у реверзибилно и иреверзибилно инфламационој и каријесно експонираној пулпи (62,88,234).

Фактор некрозе тумора α (TNF- α) сматра се основним медијатором запаљења и иницијације инфламаторне реакције јер стимулише продукцију других цитокина, активацију и експресију хемокина и адхезионих молекула као и пролиферацију ћелија (235). Директно прекривање пулпе иако је показало смањену експресију гена за TNF- α , разлика у односу на експонирану контролу није била статистички значајна ($p > 0,05$), осим у групи МТА+rhЕРО ($p < 0,05$) (**Табела 5. и График 4.а**). Раније публикована *in vitro* студија показала је да МТА може да стимулише експресију TNF- α у макрофагима (236). У прилог томе говоре и резултати студије изведене *in vivo* где је показано да након директног прекривања зубне пулпе миша применом МТА долази до пораста експресије TNF- α . Међутим, тај пораст се није разликовао од измерених TNF- α вредности у експонираној пулпи контролних животиња, 20 дана након прекривања (237). Ca(OH)₂, такође повећава експресију TNF- α у почетним фазама инфламације на сличан начин као МТА, што је претходно и показано (71). Међутим, упркос повећаној

експресији гена за TNF- α , хистолошка анализа (**Слика 2.е-и**) показала је смањење инфламације и успешан исход директног прекривања применом Ca(OH)₂ и МТА. Разлог томе може да буде тврдња постављена у истраживању *Zakharova* и сар. (238) да TNF- α остварује проинфламаторне ефекте у почетним фазама запаљења, а имунорегулаторне ефекте у каснијим фазама запаљенске реакције умањујући активност имунских ћелија. Супротно ефектима примене Ca(OH)₂ и МТА, претходна истраживања других аутора показала су да rhEPO у различитим инфламаторним обољењима умањује експресију и продукцију TNF- α од стране макрофага и мастоцита (9,189,208,223). Ипак, ово својство није било довољно да самостална примена rhEPO у директном прекривању пулпе умањи експресију гена за TNF- α у односу на експонирану контролу у нашем истраживању. Могући разлог су физичке и механичке карактеристике примењеног материјала за директно прекривање. Материјали за директно прекривање осим биоактивног дејства, треба да поседују добре физичке карактеристике како би представљали дуготрајну механичку баријеру микроорганизмима и другим надражајима ка пулпном ткиву (40).

Према *Brodbeck* и сар. (239), IL-1 β сматра се и проинфламаторним фактором и фактором зарастања ране, јер осим што стимулише имунске ћелије, лимфоците и моноците, делује и на ћелије укључене у процесе зарастања/репарације ткива као што су фибробласти. Статистички значајно ниже вредности ($p < 0,05$) експресије гена за IL-1 β у нашем истраживању детектовали смо у узорцима прекривеним Ca(OH)₂ и МТА+rhEPO, док самостална примена rhEPO и МТА није показала статистички значајну разлику у односу на експонирану контролу (**Табела 5.** и **График 4.б**). Ови резултати су у сагласности са претходним истраживањима других аутора у којима је показано да Ca(OH)₂ умањује експресију IL-1 β у хуманим неутрофилима и пулпним ћелијама *in vitro* (163,240), али и у пародонцијуму након интраканалне медикације ендодонтски лечених зуба (241). С друге стране, показано је да МТА доводи до повећања експресије IL-1 β у *in vitro* условима (240,242). Међутим, повећана експресија не означава нужно и повећану проинфламаторну активност овог цитокина. У запаљенским процесима, мастоцити, макрофаги и неутрофили продукују IL-1 β у неактивној форми, а активира се активацијом инфламозома и каспазе-1 (52). Претходним истраживањем *Peng* и сар. (189), показано је да EPO делује на смањење секреције IL-1 β од стране макрофага. Такође, третман применом rhEPO пре индуковања исхемичне повреде бубрега пацова, довео је до значајног смањења mRNA за IL-1 β у студији *Zhang* и сар. (243). Супротно томе, студија ефеката на бубреге свиња показала је да EPO стимулише продукцију неактивне форме, али умањује експресију крајње активне форме IL-1 β (244).

Интерферон γ (IFN- γ) је значајан фактор урођене и стечене имуности и запаљенске реакције. Међутим, показано је да може да делује стимулативно на минерализационе процесе у мезенхимским и пулпним матичним ћелијама (60). У претходним истраживањима других аутора, показано је да примена Ca(OH)₂ и МТА снижава експресију IFN- γ у *in vitro* и *in vivo* условима (237,241). Такође, експресија IFN- γ може бити умањена деловањем rhEPO и његових деривата (245–247). У сагласности са тим, резултати нашег истраживања показали су значајно смањење ($p < 0,05$) релативне експресије гена за IFN- γ у пулпи директно прекривеној применом Ca(OH)₂, МТА или МТА+rhEPO. Међутим, директно прекривање самосталном применом rhEPO није умањило експресију у односу на експонирану, већ је била значајно већа у односу на здраву контролу (**Табела 5.** и **График 4.в**).

Интерлеукин 6 (IL-6) је плеоморфни цитокин укључен у одговор на инфекцију и трауму, кога синтетишу бројне ћелије укључујући макрофаге, неутрофиле, фибробласте и ендотелијалне ћелије (62). Према претходним истраживањима других аутора значајна експресија IL-6 показана је у инфламираној зубној пулпи, док у здравој зубној пулпи експресија овог цитокина готово изостаје (37,66,88,234). У студији на хуманој пулпи, експресија IL-6 била је скоро 3500 пута већа у инфламираној у односу на здраву зубну пулпу (66). У нашем истраживању, релативна експресија гена за IL-6 била је већа у скоро свим групама са директним прекривањем, осим у Ca(OH)₂, а распон вредности увећања износио је од приближно 9 пута колико је било у rhEPO групи до 14 пута у MTA+rhEPO групи (**Табела 6.** и **График 5.а**). Претходним истраживањима других аутора је показано да различите формулације MTA и други калцијум силикатни цементи повећавају експресију IL-6 *in vitro* (49,87,242). Супротно њима, показано је да rhEPO инхибира продукцију и експресију IL-6 (215,243,247). Међутим, *Bader* и сар. (214) демонстрирали су да заједничком применом IL-6 и rhEPO у моделима хроничних рана коже, синергично делују на стимулацију миграције и диференцијације матичних ћелија коже. IL-6 обавља различите биолошке функције у инфламацији пулпе укључујући стимулацију продукције антитела, активацију Т лимфоцита, диференцијацију В лимфоцита, секрецију протеина акутне фазе, хематопоезу и стимулација остеокласта (62). Уз то, он стимулише васкуларну пермеабилност и доводи до едема инфламираног ткива (65). Међутим, IL-6 се приписују и имунорегулаторна својства и регенеративни потенцијал у другим ткивима, што тек треба истражити у ткиву пулпе (248).

Интерлеукин 8 (IL-8) је снажан хемоатрактант и активатор неутрофила. У обољењима пулпе продукују га имунске ћелије пулпе, ендотелијалне ћелије и одонтобласти као брзи одговор на инфламаторни стимулус активирајући акутну запаљенску реакцију (68,234). С обзиром да пацови не поседују ген за IL-8, у нашем истраживању посматрали смо експресију GRO гена, који се сматра хомологом хуманог гена за IL-8, а његов продукт показује функционалну сличност са IL-8 (249). У претходним студијама других аутора, инфламирана пулпа показала је значајно вишу експресију IL-8 у односу на здраву (53,62,88). Слично томе, у нашем истраживању, највише вредности експресије гена за GRO показане су у експонираној пулпи пацова (**Табела 6.** и **График 5.б**). Разлог може бити стална изложеност пулпног ткива микробиолошким чиниоцима усне шупљине, што доводи до стимулације ћелије на продукцију GRO протеина (или IL-8 у хуманим ћелијама) као и хемотаксе и активације неутрофила (53). *In vitro* је показано да rhEPO умањује експресију IL-8 у хуманим неутрофилима (215), док је Ca(OH)₂ и MTA повећавају у односу на контролу (240). Резултати претходно наведених студија у супротности су са добијеним резултатима експресије гена за GRO у *in vivo* условима у нашем истраживању. Најниже вредности гена за GRO у односу на експонирану показане су у MTA групи, док вредности у rhEPO, Ca(OH)₂ и MTA+rhEPO групама, иако су биле ниже у односу на експонирану пулпу, нису биле статистички значајне (**Табела 6.** и **График 5.б**). Ове разлике могу бити узроковане механичким и атхезивним својствима MTA који уз формирану дентински мост високог квалитета, представља бољу механичку баријеру микроорганизмима индиректно умањујући експресију гена за GRO (40).

Интерлеукин 10 (IL-10) је најзначајнији имунорегулаторни цитокин који делује негативном повратном спрегом смањујући синтезу проинфламаторних цитокина и активност макрофага (36). У студији *Elsalhy* и сар. (234) експресија IL-10 била је највиша у узорцима каријесно експониране пулпе, затим иреверзибилно инфламиране, а најмање у узорцима здраве пулпе. Већом експресијом IL-10 у почетним фазама

запаљења, пулно ткиво покушава да супримира развој иреверзибилног оштећења (234). С друге стране, *de Brito* и сар. (250) показали су у експерименталном моделу периапикалних лезија да је повећање експресије IL-10 повезано са смањењем експресије проинфламаторних цитокина указујући на поларизацију Th1 у Th2 имунски одговор и отпочињање репараторних процеса. У нашем истраживању, иако је вредност експресије гена за IL-10 била повишена у експонираној пулпи, статистички значајно већа вредност у односу на здраву контролу од скоро 7 и 4 пута, била је присутно само у rhEPO и МТА групама (**Табела 7.** и **График 6.а**). Ови резултати су у складу са претходним истраживањима других аутора где је показано да Ca(OH)₂ умањује експресију IL-10 у односу на инфламирану контролу (241), док МТА доводи до увећања експресије IL-10 у култури макрофага *in vitro* (236). *Sarica* и *Altun* (251) показали су да локална и системска примена rhEPO у моделу повреде периферних нерава, доводи до значајног повећања експресије IL-10 што за последицу има смањења експресије проинфламаторних цитокина. У складу са тим, резултати нашег истраживања показали су да самостална примена rhEPO доводи до значајног увећања експресије гена за IL-10 у односу на здраву контролу за разлику од примене rhEPO и МТА заједно (**Табела 7.** и **График 6.а**).

Трансформишући фактор раста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) је такође значајан имунорегулаторни фактор, али и фактор дентиногенезе у репараторним процесима зарастања директно прекривене пулпе (57,74–76). Ефекат појачане продукције TGF- $\beta 1$ или његова експресије из дентинског матрикса сматра се најзначајнијим фактором стимулације диференцијације ћелија сличних одонтобластима и формирања репараторног дентинског моста (252). Познато је да МТА у директном прекривању стимулише експресију TGF- $\beta 1$ у пулпном ткиву (69), што је у складу са резултатима наше студије (**Табела 7.** и **График 6.б**). Такође, у сагласности са резултатима нашег истраживања, претходна истраживања других аутора показала су да rhEPO стимулише експресију TGF- $\beta 1$ у *in vivo* условима означавајући овај молекул најзначајнијим за остваривања регенеративних и репаративних ефеката rhEPO (210,211,253). Висока експресија гена за TGF- $\beta 1$ у rhEPO групи у односу на здраву контролу (око 12 пута виша) може бити разлог успешности на овај начин примењеног материјала у формирању дентинског моста, упркос већем степену запаљења пулпе у односу на друге материјале за директно прекривање.

Обзиром да цитокини не делују самостално у запаљењима пулпе, већ синергистички или антагонистички, однос заступљености проинфламаторних и имунорегулаторних цитокина у посматраним узорцима сматра се важнијим индикатором стања пулног ткива него њихова појединачна вредност (234). У складу са тим, анализирали смо односе експресије гена за проинфламаторне (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-6 и GRO) и имунорегулаторне цитокине, IL-10 и TGF- $\beta 1$ (**Графици 7.** и **8.**). Анализом добијених резултата, потврђене су највише вредности односа у експонираној пулпи, што је било у сагласности са хистолошком анализом (**Табела 3.** и **График 1.а**). У истраживању *Elsalhy* и сар. (234) показано је да су односи IL-8/IL-10 и IL-6/IL-10 значајно виши у иреверзибилном пулпитису у односу на групу са каријесом и здраву контролу, док односи IL-2/IL-10, TNF- α /IL-10 и IFN- γ /IL-10 нису били различити по групама. У сагласности са овим резултатима био је добијени однос GRO/IL-10 у нашем истраживању (**График 7.д**), док су друге анализе односа показале различите резултате. Директно прекривање пулпе применом rhEPO, МТА и МТА+rhEPO показало је значајно смањење односа TNF- α /IL-10, IL-1 β /IL-10, IFN- γ /IL-10 и GRO/IL-10, али не и односа IL-6/IL-10 у поређењу са експонираном контролу (**График 7.**). С друге стране, директно прекривање применом Ca(OH)₂ умањило је вредности односа IL-1 β /IL-10,

IFN- γ /IL-10 и IL-6/IL-10, али не и TNF- α /IL-10 и GRO/IL-10 (**График 7.**). Када су посматрани односи проинфламаторних цитокина и TGF- β 1, сви материјали показали су подједнако значајно смањење вредности односа TNF- α /TGF- β 1, IL-1 β /TGF- β 1 и IFN- γ /TGF- β 1 у поређењу са експонираном контролом (**График 8.**). Вредност односа IL-6/TGF- β 1 била је једино умањена у Ca(OH)₂ групи, а односа GRO/TGF- β 1 у МТА групи у поређењу са експонираном контролом (**График 8.**). Овакви резултати наше студије указују да примена rhEPO, самостално или у комбинацији са МТА, остварује сличан ефекат као примена МТА, златног стандарда у терапији директним прекривањем пулпе. С друге стране, разлике у вредностима појединих односа указују на различите механизме посматраних материјала у инфламаторним и репараторним процесима у зубној пулпи.

5.3 Ефекти препарата који су садржали rhEPO на параметре минерализације зубне пулпе

Уобичајено, материјали за директно прекривање осим што треба да умање инфламацију и спрече настанак иреверзибилних оштећења пулпе, треба и да стимулишу обнову прекинутог дентина стварањем континуираног слоја репараторног дентина (135). Формирани дентински мост представља заштитну баријеру спречавајући или отежавајући пролазак оштећујућим наддражајима ка преосталом пулпном ткиву. Најчешће коришћени материјали за директно прекривање, били су способни да промовишу формирање репараторног дентина са успехом до 80% у узорцима прекривеним применом Ca(OH)₂ и 100% у узорцима прекривеним применом МТА у претходним студијама (113). Слично претходним студијама других аутора, и у нашем истраживању већина узорака пулпе прекривене применом Ca(OH)₂ или МТА показало је формирање минерализованог ткива на месту експонирања пулпе (**Слика 2.е-и**). У нашем истраживању по први пут испитиван је и ефекат директног прекривања зубне пулпе применом rhEPO, самостално и у комбинацији са МТА. Оба начина примене rhEPO показала су позитивне ефекте на промоцију минерализације пулпног ткива и формирања дентинског моста, а кватификациона анализа хистолошких препарата, показала је подједнаку ефикасност rhEPO и rhEPO+МТА са Ca(OH)₂ и МТА (**Табела 3.** и **График 1.б**). Обзиром да до сада није истраживан утицај rhEPO на дентиногенезу, информације о његовим позитивним ефектима на минерализацију могу се добити у претходним студијама ефеката rhEPO на минерализацију и репарацију коштаног дефаката. Наиме, rhEPO показао је значајан позитиван ефекат у репарацији и ремоделацији мандибуларне и бедрене кости глодара (254,255). Разлог за позитиван ефекат rhEPO на регенерацију може бити способност EPO да стимулише ћелијску пролиферацију, диференцијацију, ангиогенезу и експресију остеогених и ангиогених фактора раста (191,218,254). Претходно је показано да rhEPO стимулише ангиогенезу у култури DPSC *in vitro* (199). Важан аспект у обезбеђивању дуготрајног успеха директног прекривања пулпе је и квалитет формираног дентинског моста. Показано је да у скоро 90% формираних мостова испод Ca(OH)₂ показује зоне непотпуно формираног дентина, тунел дефекте или формирано минерализовано ткиво са ћелијским инклузијама који могу престављати пут ширења микроорганизама и узрок неуспеха терапије (114). Квалитет формираног дентинског баријера није био у сфери садашњег истраживања, међутим, примећене су и описане поједине зоне неправилно формираног минерализованог ткива у Ca(OH)₂ и rhEPO групи (**Слика 2.д-ж**).

Као што је познато, репаративни дентин формирају ћелије сличне одонтобластима које су диферентовале из DPSC. Такође је познато да материјали за директно прекривање промовишу диференцијацију ћелија зубне пулпе која се огледала у стимулацији експресије маркера одонтобластне активности ћелија што је показано *in vitro* и *in vivo* (87,106,121,256–258). Како би испитали ефекте материјала који су садржали rhEPO на промоцију дентиногенезе, анализирали смо ефекте експонирања и директног прекривања зубне пулпе на маркере одонтобластне диференцијације ALP, OCN, DSPP и DMP-1 (**Табела 10.** и **График 9.**). Резултати наше студије показали су да је директно прекривање пулпе Ca(OH)₂ и МТА довело је до статистички значајног пораста експресије гена за ALP у односу на здраву контролу (**Табела 10.** и **График 9.а**), што је у сагласности са резултатима претходних истраживања из доступне литературе (87,256,259). Међутим, за разлику од претходних истраживања других аутора (87,256,257), резултати наше студије нису показали значајно увећање експресије других маркера (OCN, DSPP и DMP-1) у Ca(OH)₂ и МТА групама у односу на здраву контролу. Осим што промовише ангиогенезу у различитим ткивима, показано је да rhEPO стимулише и диференцијацију прогениторских матичних ћелија (201,260). Претходно је такође показано да rhEPO стимулише остеогену диференцијацију периодонталних матичних ћелија *in vitro* уз повећану експресију гена за ALP и OCN (260). У нашем истраживању, примена rhEPO показала је једнаки ефекат на експресију гена за ALP и DSPP као и Ca(OH)₂ и МТА групе. Узевши све наведено, ови резултати додатно подржавају резултате хистолошке анализе у којима су препарати који су садржали rhEPO подједнако изазвали формирање минерализованог дентинског моста као и уобичајени материјали за директно прекривање. Међутим, ефекти препарата који су садржали rhEPO на експресију гена за OCN и DMP-1 су се разликовали. RhEPO и МТА+rhEPO групе, иако није статистички значајна, показали су више вредности експресије гена за OCN, док је експресија гена за DMP-1 била статистички значајно већа у односу на здраву контролу у МТА+rhEPO групи (**Табела 10.** и **График 9.**). Разлике у експресији гена за поједине маркере дентиногенезе могу се приписати разликама у утицајима материјала на експресију гена за проинфламаторне и имунорегулаторне цитокине, јер је показано да експресије цитокина могу бити у различитој корелацији са ALP, OCN и DMP-1 (48,84,88,97).

5.4 Ефекти препарата за директно прекривање на параметре оксидативног стреса

У току инфламације, фагоцитне ћелије, макрофаги и неутрофили, продукују реактивне кисеоничне и азотне врсте (ROS и RNS) које су способне да у интеракцији са органским материјама доводе уништења патогена, али и околних здравих ћелија изазивајући оксидативни стрес (261,262). Стања која су повезана са оксидативним стресом као што су запаљење, хипоксија или ефекти системских обољења често се јављају у зубној пулпи (263). Обољења пулпе и апексног пародонцијума доводе до поремећаја локалног оксидативног статуса, а показано је да поремећај може бити и системски изазивајући ефекте оксидативног стреса и у другим органима (262–265). Како би се избориле са негативним ефектима оксидативног стреса, ћелија организма поседују антиоксидативне системе који укључују ензиме, каталазу, супероксид дизмутазу, хидроген пероксидазу и систем глутатион пероксидазе и редуктазе између осталих (262,263,266,267). Такође је показано да ендодонтска терапија може побољшати статус оксидативног система (261). На том основу, нашим истраживањем истражен је ефекат експонирања и терапије пулпе директним прекривањем на системске параметре оксидативног стреса.

Као што је и очекивано, изражена инфламација у експонираној контроли приказала је и значајно увећање системских прооксидативних параметара, NO_2^- и O_2^- (**График 10.6 и в**) у овом истраживању. Иницијално повећано стварање ROS сматра се повољним по зарастање рана, због свог антимикробног ефекта и стимулације ангиогенезе. С друге стране, према литературним подацима, продужено и повећано стварање ROS повезано је са успореним зарастањем и хроничним ранама (268). У нашем истраживању, директно прекривање пулпе умањило је системске вредности поменутих прооксидативних параметара у односу на експонирану контролу, што је у складу са показаним мањим инфламаторним одговором и повољним зарастањем пулпних рана у овим групама.

Због своје изражене каталитичке активности у уклањању O_2^- радикала, SOD називају антиинфламаторним ензимом, а његова смањења активност повезана је са повећањем пријемчивости ткива за запаљенске процесе (269). Ова тврдња у складу је са резултатима нашег истраживања у коме је вредност SOD значајно умањена у експонираној у односу на здраву контролу (**График 11.6**). Такође, директно прекривање пулпе довело је до повећања активности антиоксидативних параметара у односу на експонирану контролу као што је био случај у вредностима SOD и GSH (**График 11.6 и в**) или су вредности биле приближне здравој контроли као за CAT и GSH (**График 11.а и в**).

Bailey и сар. (270) показали су да ЕРО може да испољи антиоксидативни ефекат у случајевима локалног или системског оксидативног дисбаланса. ЕРО може да делује антиоксидативно директним путем уклањајући ROS, индукцијом хеме оксигеназе-1 или стимулацијом антиоксидативних ензима SOD, CAT и глутатион пероксидазе (270,271). *Katavetin* и сар. (271) сматрају да ЕРО делује антиоксидативно и индиректним путем стимулацијом продукције еритроцита услед које долази до повећане потрошње гвожђа и смањења Фентонове реакције, а млада црвена крвна зрнца су богата антиоксидативним ензимима. Према резултатима нашег истраживања, примена rhEPO показала је позитиван системски антиоксидативни ефекат изражен кроз смањење вредности O_2^- у односу на експонирану контролу и вредности TBARS, NO_2^- и H_2O_2^- које су биле једнаке здравој контроли (**Табела 11. и График 10.а**). У *in vitro* истраживању *Zheng* и сар. (272) ЕРО је довео до смањења вредности ROS и малондиалдехида, параметра липидне пероксидације, у моделу оксидативног стреса матичних ћелија периодонталног лигамента. Уз наведено, третман ћелија са ЕРО довео је и до повећања SOD (272). У нашем истраживању, rhEPO повећао је вредности SOD и активности GSH у односу на експонирану контролу. Интересантно, израженији ефекат у регулацији оксидативног стреса показала је комбинација МТА+ rhEPO. Штавише, ова комбинације показала је увећање вредности SOD и значајнију активности GSH од самосталне примене МТА (**График 11.6 и в**). Овакав резултат наше студије указује на могући синергистички ефекат МТА и ЕРО на антиинфламаторна, антиоксидативна и регенеративна својства материјала у терапији директним прекривањем пулпе. Томе сведоче и резултати претходних студија других аутора у којима је комбинација МТА са другим биолошким супстанцама показала значајно повољније ефекте на ћелије пулпе или параметре зарастања пулпне ране у односу на самостално примењен МТА (121,149).

6. ЗАКЉУЧАК



6. ЗАКЉУЧАК

На основу анализе добијених резултата ове студије изведени су следећи закључци:

1. Реакција зубне пулпе на експонирање праћена је израженом експресијом ЕРО- R , а директно прекривање пулпе калцијум хидроксидом или МТА праћено је израженом експресијом ЕРО.
2. Експонирање зубне пулпе праћено је израженом инфламацијом пулпе, а степен инфламације је значајно нижи након директног прекривања пулпе различитим материјалима.
3. Директно прекривање пулпе препаратима који садрже rhЕРО умањује степен инфламације експониране зубне пулпе, а ефекат је сличан уобичајено коришћеним материјалима за директно прекривање, и то:
 - Самостално примењен rhЕРО доводи до приближно једнаког степена инфламације као и калцијум хидроксид;
 - Примењен МТА+rhЕРО доводи до приближно једнаког степена инфламације као и самостално примењен МТА.
4. Директно прекривање експониране зубне пулпе доводи до формирања дентинског моста. Квалитет дентинског моста формираног након директног прекривања препаратима који садрже rhЕРО је сличан квалитету постигнутим са уобичајено коришћеним материјалима (калцијум хидроксидом и МТА).
5. Директно прекривање експониране зубне пулпе доводи до смањења експресије проинфламаторних цитокина (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ и GRO) у односу на експонирану нетретирану зубну пулпу. Експресија имунорегулаторних цитокина (TGF- β 1 и IL-10) значајно је виша у директно прекривеној него у експонираној нетретираној зубној пулпи у односу на здраву контролу. Овај закључак додатно потврђује анализа односа проинфламаторних/имунорегулаторних цитокина где експонирана нетретирана пулпа показује значајно више вредности односа IL-1 β /IL-10, IFN- γ /IL-10, TNF- α /TGF- β , IL-1 β /TGF- β и IFN- γ /TGF- β у поређењу са зубном пулпом директно прекривеном било којим од испитиваних материјала.
6. Постоји разлика у експресији проинфламаторних али не и имунорегулаторних цитокина између зубних пулпи директно прекривених препаратима који садрже rhЕРО у односу на калцијум хидроксид и МТА. Експресија цитокина IFN- γ и IL-6 виша је након директног прекривања пулпе препаратима који садрже rhЕРО у односу на калцијум хидроксид, а експресија цитокина GRO виша је након директног прекривања пулпе препаратима који садрже rhЕРО у односу на калцијум хидроксид и МТА.
7. Директно прекривање доводи до повећања експресије маркера одонтобласте активности (ALP, OCN, DSPP и DMP-1) у зубној пулпи у односу на здраву контролу. Експонирање зубне пулпе није довело до повећања маркера одонтобласте активности у односу на здраву контролу.

8. Постоји разлика у експресији маркера одонтобластне активности у пулпи директно прекривеној препаратима који садрже rhEPO у односу на калцијум хидроксид и МТА. Директно прекривање применом МТА+rhEPO доводи до значајног повећања експресије маркера одонтобластне активности (OCN и DMP-1) у односу на експонирану нетретирану пулпу за разлику од директног прекривања другим испитиваним материјалима. Директно прекривање применом МТА доводи до значајног повећања експресије маркера одонтобластне активности ALP у односу на експонирану нетретирану пулпу за разлику од директног прекривања другим испитиваним материјалима.
9. Постоји разлика у вредностима системских параметара оксидативног стреса између група са здравом, експонираном и директно прекривеном пулпом. Директно преривање пулпе препаратима који садрже rhEPO снижава вредности прооксидативних параметара (TBARS, NO₂⁻, O₂⁻ и H₂O₂⁻) у односу на експонирану нетретирану и здраву зубну пулпу. Директно преривање пулпе препаратима који садрже rhEPO повећава вредности антиоксидативних параметара (CAT, SOD и GSH) у односу на експонирану нетретирану пулпу. Ефекти препарата који садрже rhEPO слични су ефектима директног прекривања зубне пулпе калцијум хидроксидом и МТА.

Препознавање активности EPO и EPO-R након експонирања и директног прекривања зубне пулпе даје увид у нови репараторни механизам зарастања пулпне ране. Познавање свих механизма укључених у зарастање пулпне ране омогућава истраживања и примену нових материјала који ће циљано активирати наведене механизме и повећати извесност успеха терапије директним прекривањем.

На основу резултата нашег истраживања доноси се закључак да еритропоетин може бити погодан за примену у терапији директним прекривањем зубне пулпе јер остварује ефекте који су слични примени златног стандарда терапије. Такође, комбинација еритропоетина и МТА остварила је ефекте који су приближни, а у појединим аспектима и побољшани у односу на златни стандард. Позитивно дејство препарата који су садржали еритропоетин на зарастање пулпне ране може се приписати његовом антиинфламаторном, антиапоптотском, антиоксидативном и регенеративном деловању управо преко EPO/EPO-R механизма. Даљим истраживањима потребно је јасније дефинисати механизме деловања еритропоетина на зубну пулпу, али и одговарајуће дозе, формулације и облике апликације овог материјала у терапији директним прекривањем пулпе.

7. ЛИТЕРАТУРА



7. ЛИТЕРАТУРА

1. Farges J-C, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, Cooper PR. Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:230251.
2. Duncan HF, Galler KM, Tomson PL, Simon S, El-Karim I, Kundzina R, Krastl G, Dammaschke T, Fransson H, Markvart M, Zehnder M, Bjørndal L. European Society of Endodontology position statement: Management of deep caries and the exposed pulp. *Int Endod J.* 2019;52:923–34.
3. Lipski M, Nowicka A, Kot K, Postek-Stefańska L, Wysoczańska-Jankowicz I, Borkowski L, Andersz P, Jarzabek A, Grocholewicz K, Sobolewska E, Woźniak K, Drożdżik A. Factors affecting the outcomes of direct pulp capping using Biodentine. *Clin Oral Investig.* 2018;22:2021–9.
4. Mente J, Hufnagel S, Leo M, Michel A, Gehrig H, Panagidis D, Saure D, Pfefferle T. Treatment outcome of mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide direct pulp capping: long-term results. *J Endod.* 2014;40:1746–51.
5. Louwakul P, Lertchirakarn V. Response of inflamed pulps of rat molars after capping with pulp-capping material containing fluocinolone acetonide. *J Endod.* 2015;41:508–12.
6. da Rosa WLO, Cocco AR, Silva TM d., Mesquita LC, Galarça AD, Silva AF d., Piva E. Current trends and future perspectives of dental pulp capping materials: A systematic review. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater.* 2018;106:1358–68.
7. Jelkmann W. Erythropoietin. *Front Horm Res.* 2016;47:115–27.
8. Gong Q, Jiang H, Wei X, Ling J, Wang J. Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in human dental pulp. *J Endod.* 2010;36:1972–7.
9. Nairz M, Sonnweber T, Schroll A, Theurl I, Weiss G. The pleiotropic effects of erythropoietin in infection and inflammation. *Microbes Infect.* 2012;14:238–46.
10. Li J, Guo W, Xiong M, Zhang S, Han H, Chen J, Mao D, Yu H, Zeng Y. Erythropoietin facilitates the recruitment of bone marrow mesenchymal stem cells to sites of spinal cord injury. *Exp Ther Med.* 2017;13:1806–12.
11. Goldberg M. Pulp Anatomy and Characterization of Pulp Cells. In: Goldberg M, editor. *The Dental Pulp.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 13–34.
12. Balic A, Thesleff I. Tissue Interactions Regulating Tooth Development and Renewal. *Curr Top Dev Biol.* 1st ed. 2015;115:157–86.
13. Kallianpur S. Pulp. In: Kumar GS, editor. *Orban's Oral Histology and Embryology.* 14th ed. New Delhi: Reed Elsevier India; 2015. p. 92–115.
14. Kawashima N, Okiji T. Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex. *Congenit Anom (Kyoto).* 2016;56:144–53.
15. Zhang YD, Chen Z, Song YQ, Liu C, Chen YP. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell Res.* 2005;15:301–16.
16. Okiji T. Pulp as a connective tissue. In: Hargreaves KM, Goodis H, Tay FR, editors. *Seltzer and Bender's dental pulp.* 2nd ed. Hanover Park, IL: Quintessence Publishing Co Inc; 2012. p. 67–89.
17. Popovic M, Zivanovic S, Vucicevic T, Grujovic M, Papic M, Kanjevac T. Cone-beam computed tomography study of tooth root and canal morphology of permanent molars

- in a Serbian population. *Vojnosanit Pregl.* 2020;77:470–8.
18. Papic M, Papic M, Zivanovic S, Vuletic M, Zdravkovic D, Misic A, Miletic Kovacevic M, Popovic M. The prevalence of oval-shaped root canals: A morphometric study using cone-beam computed tomography and image analysis software. *Aust Endod J.* 2022;48:158–69.
 19. Fehrenbach M, Popowics T. *Illustrated Dental Embryology, Histology, and Anatomy.* 4th ed. Maryland Heights: Elsevier Saunders; 2016.
 20. Yildirim S. Dental Pulp Is a Connective Tissue. In: Yildirim S, editor. *Dental Pulp Stem Cells.* New York, NY: Springer US; 2013. p. 17–24.
 21. Nanci A. *Ten Cate's Oral Histology.* 9th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2017.
 22. Iijima T, Zhang JQ. Three-dimensional wall structure and the innervation of dental pulp blood vessels. *Microsc Res Tech.* 2002;56:32–41.
 23. Berggreen E, Heyeraas KJ. Effect of the sensory neuropeptide antagonists h-CGRP((8-37)) and SR 140.33 on pulpal and gingival blood flow in ferrets. *Arch Oral Biol.* 2000;45:537–42.
 24. Rajkumar K, Ramya R. *Textbook of Oral Anatomy, Histology, Physiology and Tooth Morphology.* 2nd ed. New Delhi: Wolters Kluwer Health; 2017.
 25. Berman LH, Hargreaves KM, editors. *Cohen's Pathways of the Pulp.* 12th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2021.
 26. Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner J, editors. *Ingle's Endodontics.* Hamilton, Ontario: BC Decker Inc; 2008.
 27. Nakanishi T, Takegawa D, Hirao K, Takahashi K, Yumoto H, Matsuo T. Roles of dental pulp fibroblasts in the recognition of bacterium-related factors and subsequent development of pulpitis. *Jpn Dent Sci Rev.* 2011;47:161–6.
 28. Tsai CL, Hung SL, Lee YY, Ho YC, Yang SF. The role of fibroblasts in the modulation of dental pulp inflammation. *J Formos Med Assoc.* 2022;121:342–9.
 29. Gronthos S, Mankani M, Brahim 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;97:13625–30.
 30. Bergenholtz G, Horsted-Bindslev P, Reit C, editors. *Textbook of Endodontology.* 2nd ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2010.
 31. Rajan S, Ljunggren A, Manton DJ, Björkner AE, McCullough M. Post-mitotic odontoblasts in health, disease, and regeneration. *Arch Oral Biol.* 2020;109:104591.
 32. Larjava H, editor. *Oral Wound Healing Cell Biology and Clinical Management Vancouver.* Oxford: John Wiley & Sons, Inc; 2012.
 33. Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, Septier D, Carrouel F, Durand S, Chaussain-Miller C, DenBesten P, Veis A, Poliard A. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res.* 2008;58:137–47.
 34. Al Natour B, Lundy FT, Moynah PN, About I, Jeanneau C, Irwin CR, Domberoski Y, El Karim IA. Odontoblast cell death induces NLRP3 inflammasome-dependent sterile inflammation and regulates dental pulp cell migration, proliferation and differentiation. *Int Endod J.* 2021;54:941–50.
 35. Zanini M, Meyer E, Simon S. Pulp Inflammation Diagnosis from Clinical to Inflammatory Mediators: A Systematic Review. *J Endod.* 2017;43:1033–51.

36. Hahn C Lo, Liewehr FR. Update on the Adaptive Immune Responses of the Dental Pulp. *J Endod.* 2007;33:773–81.
37. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent.* 2010;38:687–97.
38. Eba H, Murasawa Y, Iohara K, Isogai Z, Nakamura H, Nakamura H, Nakashima M. The Anti-Inflammatory Effects of Matrix Metalloproteinase-3 on Irreversible Pulpitis of Mature Erupted Teeth. *PLoS One.* 2012;7:1–9.
39. Hernández-Ríos P, Pussinen PJ, Vernal R, Hernández M. Oxidative Stress in the Local and Systemic Events of Apical Periodontitis. *Front Physiol.* 2017;8:869.
40. KOMABAYASHI T, ZHU Q, EBERHART R, IMAI Y. Current status of direct pulp-capping materials for permanent teeth. *Dent Mater J.* 2016;35:1–12.
41. Zhu C, Ju B, Ni R. Clinical outcome of direct pulp capping with MTA or calcium hydroxide: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8:17055–60.
42. Paula AB, Laranjo M, Marto C-M, Paulo S, Abrantes AM, Fernandes B, Casalta-Lopes J, Marques-Ferreira M, Botelho MF, Carrilho E. Evaluation of dentinogenesis inducer biomaterials: an in vivo study. *J Appl Oral Sci.* 2020;28:e20190023.
43. Song M, Yu B, Kim S, Hayashi M, Smith C, Sohn S, Kim E, Lim J, Stevenson RG, Kim RH. Clinical and Molecular Perspectives of Reparative Dentin Formation: Lessons Learned from Pulp-Capping Materials and the Emerging Roles of Calcium. *Dent Clin North Am.* 2017;61:93–110.
44. da Rosa WLO, Piva E, da Silva AF. Disclosing the physiology of pulp tissue for vital pulp therapy. *Int Endod J.* 2018;51:829–46.
45. Duncan HF. Present status and future directions—Vital pulp treatment and pulp preservation strategies. *Int Endod J.* 2022;1–15.
46. Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF. Correlation between clinical and histologic pulp diagnoses. *J Endod.* 2014;40:1932–9.
47. Duncan HF, Yamauchi Y. Current and Future Views on Pulp Exposure Management and Epigenetic Influences. *Clin Approaches Endod Regen.* 2019;55–75.
48. Goldberg M, Njeh A, Uzunoglu E. Is Pulp Inflammation a Prerequisite for Pulp Healing and Regeneration? *Mediators Inflamm.* 2015;2015:1–11.
49. Giraud T, Jeanneau C, Rombouts C, Bakhtiar H, Laurent P, About I. Pulp capping materials modulate the balance between inflammation and regeneration. *Dent Mater.* 2019;35:24–35.
50. Mjör IA, Dah E, Cox CF. Healing of pulp exposures: an ultrastructural study. *J Oral Pathol Med.* 1991;20:496–501.
51. Lin SI, Lin LD, Chang HH, Chang MC, Wang YL, Pan YH, Huang GF, Lin HJ, Jeng JH. IL-1 β induced IL-8 and uPA expression/production of dental pulp cells: Role of TAK1 and MEK/ERK signaling. *J Formos Med Assoc.* 2018;117:697–704.
52. Yazdi AS, Ghoreschi K. The Interleukin-1 Family. In: Ma X, editor. *Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2016. p. 21–9.
53. Silva ACO, Faria MR, Fontes A, Campos MS, Cavalcanti BN. Interleukin-1 beta and interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps. *J Appl Oral Sci.* 2009;17:527–32.
54. D’Souza R, Brown LR, Newland JR, Levy BM, Lachman LB. Detection and

- characterization of interleukin-1 in human dental pulps. *Arch Oral Biol.* 1989;34:307–13.
55. Barkhordar RA, Ghani QP, Russell TR, Hussain MZ. Interleukin-1 β activity and collagen synthesis in human dental pulp fibroblasts. *J Endod.* 2002;28:157–9.
 56. Serita S, Tomokiyo A, Hasegawa D, Hamano S, Sugii H, Yoshida S, Mizumachi H, Mitarai H, Monnouchi S, Wada N, Maeda H. Transforming growth factor- β -induced gene product-h3 inhibits odontoblastic differentiation of dental pulp cells. *Arch Oral Biol.* 2017;78:135–43.
 57. Galler KM, Weber M, Korkmaz Y, Widbiller M, Feuerer M. Inflammatory response mechanisms of the dentine–pulp complex and the periapical tissues. *Int J Mol Sci.* 2021;22:1–23.
 58. Burke JD, Young HA. IFN- γ : A cytokine at the right time, is in the right place. *Semin Immunol.* 2019;43:101280.
 59. Markovic M, Miljkovic D, Momcilovic M, Popadic D, Miljkovic Z, Savic E, Ramic Z, Mostarica Stojkovic M. Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in rats correlates with TH1 and TH17-inducing cytokine profiles. *Mol Immunol.* 2009;47:141–6.
 60. Nam OH, Lee HS, Kim JH, Chae YK, Hong SJ, Kang SW, Lee HS, Choi SC, Kim Y. Differential gene expression changes in human primary dental pulp cells treated with biodentine and theracal lc compared to mta. *Biomedicines.* 2020;8:1–14.
 61. Sonoda S, Yamaza H, Ma L, Tanaka Y, Tomoda E, Aijima R, Nonaka K, Kukita T, Shi S, Nishimura F, Yamaza T. Interferon-gamma improves impaired dentinogenic and immunosuppressive functions of irreversible pulpitis-derived human dental pulp stem cells. *Sci Rep.* 2016;6:1–12.
 62. Hirsch V, Wolgin M, Mitronin A V., Kielbassa AM. Inflammatory cytokines in normal and irreversibly inflamed pulps: A systematic review. *Arch Oral Biol.* 2017;82:38–46.
 63. Azuma MM, Samuel RO, Gomes-Filho JE, Dezan-Junior E, Cintra LTA. The role of IL-6 on apical periodontitis: A systematic review. *Int Endod J.* 2014;47:615–21.
 64. Sabir A, Sumidarti A. Interleukin-6 expression on inflamed rat dental pulp tissue after capped with *Trigona* sp. propolis from south Sulawesi, Indonesia. *Saudi J Biol Sci.* 2017;24:1034–7.
 65. Farges JC, Carrouel F, Keller JF, Baudouin C, Msika P, Bleicher F, Staquet MJ. Cytokine production by human odontoblast-like cells upon Toll-like receptor-2 engagement. *Immunobiology.* 2011;216:513–7.
 66. Barkhordar RA, Hayashi C, Hussain MZ. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 1999;15:26–7.
 67. Chandra S, Chandra S, Chandra G, Chandra M. Dental Pulp. In: *Textbook of Dental and Oral Histology with Embryology and Multiple Choice Questions.* Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.; 2010. p. 112–112.
 68. Levin LG, Rudd A, Bletsa A, Reisner H. Expression of IL-8 by cells of the odontoblast layer in vitro. *Eur J Oral Sci.* 1999;107:131–7.
 69. Saghiri MA, Asatourian A, Garcia-Godoy F, Sheibani N. Effect of biomaterials on angiogenesis during vital pulp therapy. *Dent Mater J.* 2016;35:701–9.
 70. Renard E, Gaudin A, Bienvenu G, Amiaud J, Farges JC, Cuturi MC, Moreau A, Alliot-

- Licht B. Immune Cells and Molecular Networks in Experimentally Induced Pulpitis. *J Dent Res.* 2016;95:196–205.
71. Reyes-Carmona JF, Santos ARS, Figueiredo CP, Felipe MS, Felipe WT, Cordeiro MM. In vivo host interactions with mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide: inflammatory molecular signaling assessment. *J Endod.* 2011;37:1225–35.
 72. Moroguchi A, Ishimura K, Okano K, Wakabayashi H, Maeba T, Maeta H. Interleukin-10 suppresses proliferation and remodeling of extracellular matrix of cultured human skin fibroblasts. *Eur Surg Res.* 2004;36:39–44.
 73. Magloire H, Romeas A, Melin M, Couble ML, Bleicher F, Farges JC. Molecular regulation of odontoblast activity under dentin injury. *Adv Dent Res.* 2001;15:46–50.
 74. Whitehouse LL, Thomson NH, Do T, Feichtinger GA. Bioactive molecules for regenerative pulp capping. *Eur Cell Mater.* 2021;42:415–37.
 75. Li Y, Lü X, Sun X, Bai S, Li S, Shi J. Odontoblast-like cell differentiation and dentin formation induced with TGF- β 1. *Arch Oral Biol.* 2011;56:1221–9.
 76. Batlle E, Massagué J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity.* 2019;50:924–40.
 77. Widbiller M, Eidt A, Lindner SR, Hiller K-A, Schweikl H, Buchalla W, Galler KM. Dentine matrix proteins: isolation and effects on human pulp cells. *Int Endod J.* 2018;51 Suppl 4:e278–90.
 78. Tojyo Y. A comparison of the alkaline phosphatases of rat dental pulp, bone, kidney, liver and intestine. *Arch Oral Biol.* 1983;28:103–7.
 79. Goseki M, Oida S, Nifuji A, Sasaki S. Properties of Alkaline Phosphatase of the Human Dental Pulp. *J Dent Res.* 1990;69:909–12.
 80. Perinetti G, Varvara G, Salini L, Tetè S. Alkaline phosphatase activity in dental pulp of orthodontically treated teeth. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2005;128:492–6.
 81. Aslantas EE, Buzoglu HD, Karapinar SP, Cehreli ZC, Muftuoglu S, Atilla P, Aksoy Y. Age-related Changes in the Alkaline Phosphatase Activity of Healthy and Inflamed Human Dental Pulp. *J Endod.* 2016;42:131–4.
 82. Spoto G, Fioroni M, Rubini C, Tripodi D, Di Stilio M, Piattelli A. Alkaline phosphatase activity in normal and inflamed dental pulps. *J Endod.* 2001;27:180–2.
 83. Sanz JL, Rodríguez-Lozano FJ, Llena C, Sauro S, Forner L. Bioactivity of bioceramic materials used in the dentin-pulp complex therapy: A systematic review. *Materials (Basel).* 2019;12:1–30.
 84. Strojny C, Boyle M, Bartholomew A, Sundivakkam P, Alapati S. Interferon Gamma-treated Dental Pulp Stem Cells Promote Human Mesenchymal Stem Cell Migration in Vitro. *J Endod.* 2015;41:1259–64.
 85. Muramatsu T, Hamano H, Ogami K, Ohta K, Inoue T, Shimono M. Reduction of osteocalcin expression in aged human dental pulp. *Int Endod J.* 2005;38:817–21.
 86. Kritikou K, Totan AR, Miricescu D, Stanescu-Spinu II, Greabu M, Imre M, Tanase M, Vinereanu A, Spinu TC, Ilinca R. Biochemical mapping of the inflamed human dental pulp. *Appl Sci.* 2021;11:10395.
 87. Chang SW, Lee SY, Kum KY, Kim EC. Effects of ProRoot MTA, bioaggregate, and micromega MTA on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod.* 2014;40:113–8.
 88. Abd-Elmeguid A, Abdeldayem M, Kline LW, Moqbel R, Vliagoftis H, Yu DC.

- Osteocalcin expression in pulp inflammation. *J Endod.* 2013;39:865–72.
89. Heinemann DEH, Siggelkow H, Ponce LM, Viereck V, Wiese KG, Peters JH. Alkaline Phosphatase Expression during Monocyte Differentiation. Overlapping markers as a link between monocytic cells, dendritic cell, osteoclasts and osteoblasts. *Immunobiology.* 2000;202:68–81.
 90. Zhu Q, Gibson MP, Liu Q, Liu Y, Lu Y, Wang X, Feng JQ, Qin C. Proteolytic processing of dentin sialophosphoprotein (DSPP) is essential to dentinogenesis. *J Biol Chem.* 2012;287:30426–35.
 91. Liu MM, Li WT, Xia XM, Wang F, Macdougall M, Chen S. Dentine sialophosphoprotein signal in dentineogenesis and dentine regeneration. *Eur Cells Mater.* 2021;42:43–62.
 92. Prasad M, Butler WT, Qin C. Dentin sialophosphoprotein in biomineralization. *Connect Tissue Res.* 2010;51:404–17.
 93. Yamakoshi Y. Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) and Dentin. *J Oral Biosci.* 2008;50:33–44.
 94. Qin C, D’Souza R, Feng JQ. Dentin Matrix Protein 1 (DMP1): New and important roles for biomineralization and phosphate homeostasis. *J Dent Res.* 2007;86:1134–41.
 95. Lu Y, Ye L, Yu S, Zhang S, Xie Y, McKee MD, Li YC, Kong J, Eick JD, Dallas SL, Feng JQ. Rescue of odontogenesis in *Dmp1*-deficient mice by targeted re-expression of DMP1 reveals roles for DMP1 in early odontogenesis and dentin apposition in vivo. *Dev Biol.* 2007;303:191–201.
 96. Chaussain C, Eapen AS, Huet E, Floris C, Ravindran S, Hao J, Menashi S, George A. MMP2-cleavage of DMP1 generates a bioactive peptide promoting differentiation of dental pulp stem/progenitor cell. *Eur Cell Mater.* 2009;18:84–95.
 97. Abd-Elmeguid A, Yu DC, Kline LW, Moqbel R, Vliagoftis H. Dentin matrix protein-1 activates dental pulp fibroblasts. *J Endod.* 2012;38:75–80.
 98. Yang B, Chen Y, Shi J. Reactive oxygen species (ROS)-based nanomedicine. *Chem Rev.* 2019;119:4881–985.
 99. Montoro LA, Turrioni APS, Basso FG, de Souza Costa CA, Hebling J. Infrared LED irradiation photobiomodulation of oxidative stress in human dental pulp cells. *Int Endod J.* 2014;47:747–55.
 100. Chen C, Huang X, Zhu W, Ding C, Huang P, Li R. H₂O₂ gel bleaching induces cytotoxicity and pain conduction in dental pulp stem cells via intracellular reactive oxygen species on enamel/dentin disc. *PLoS One.* 2021;16:1–17.
 101. Wang X, Wu TT, Jiang L, Rong D, Zhu YQ. Deferoxamine-Induced Migration and Odontoblast Differentiation via ROS-Dependent Autophagy in Dental Pulp Stem Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2017;43:2535–47.
 102. Soares DG, Gonçalves Basso F, Hebling J, De Souza Costa CA. Effect of hydrogen-peroxide-mediated oxidative stress on human dental pulp cells. *J Dent.* 2015;43:750–6.
 103. Benetti F, Briso ALF, Carminatti M, de Araújo Lopes JM, Barbosa JG, Ervolino E, Gomes-Filho JE, Cintra LTA. The presence of osteocalcin, osteopontin and reactive oxygen species-positive cells in pulp tissue after dental bleaching. *Int Endod J.* 2019;52:665–75.
 104. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Yang HC. Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast

- cell lines. *Cell Biol Toxicol.* 2006;22:39–46.
105. Dammaschke T. The history of direct pulp capping. *J Hist Dent.* 2008;56:9–23.
 106. Yu F, Dong Y, Yang YW, Lin PT, Yu HH, Sun X, Sun XF, Zhou H, Huang L, Chen JH. Effect of an experimental direct pulp-capping material on the properties and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Sci Rep.* 2016;6:1–11.
 107. Gandolfi MG, Siboni F, Botero T, Bossù M, Riccitiello F, Prati C. Calcium silicate and calcium hydroxide materials for pulp capping: Biointeractivity, porosity, solubility and bioactivity of current formulations. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2015;13:1–18.
 108. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene.* 2020;754:144855.
 109. Khan AA, Sun X, Hargreaves KM. Effect of calcium hydroxide on proinflammatory cytokines and neuropeptides. *J Endod.* 2008;34:1360–3.
 110. Zayzafoon M. Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation. *J Cell Biochem.* 2006;97:56–70.
 111. Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith AJ. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials.* 2006;27:2865–73.
 112. Hilton TJ. Keys to Clinical Success with Pulp Capping: A Review of the Literature. *Oper Dent.* 2009;34:615–25.
 113. Paula AB, Laranjo M, Marto CM, Paulo S, Abrantes AM, Casalta-Lopes J, Marques-Ferreira M, Botelho MF, Carrilho E. Direct Pulp Capping: What is the Most Effective Therapy?—Systematic Review and Meta-Analysis. *J Evid Based Dent Pract.* 2018;18:298–314.
 114. Cox CF, Sübay RK, Ostro E, Suzuki S, Suzuki SH. Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. *Oper Dent.* 1996;21:4–11.
 115. Zafar K, Jamal S, Ghafoor R. Bio-active cements-mineral trioxide aggregate based calcium silicate materials: A narrative review. *J Pak Med Assoc.* 2020;70:497–504.
 116. Didilescu AC, Cristache CM, Andrei M, Voicu G, Perlea P. The effect of dental pulp-capping materials on hard-tissue barrier formation: A systematic review and meta-analysis. *J Am Dent Assoc.* 2018;149:903–17.
 117. Li Z, Cao L, Fan M, Xu Q. Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide or Mineral Trioxide Aggregate: A Meta-analysis. *J Endod.* 2015;41:1412–7.
 118. Camilleri J. Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2008;41:408–17.
 119. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod.* 2010;36:400–13.
 120. Tomson PL, Lumley PJ, Smith AJ, Cooper PR. Growth factor release from dentine matrix by pulp-capping agents promotes pulp tissue repair-associated events. *Int Endod J.* 2017;50:281–92.
 121. Chang S-W, Kim J-Y, Kim M-J, Kim G-H, Yi J-K, Lee D-W, Kum K-Y, Kim E-C. Combined effects of mineral trioxide aggregate and human placental extract on rat pulp tissue and growth, differentiation and angiogenesis in human dental pulp cells. *Acta Odontol Scand.* 2016;74:298–306.
 122. Paranjpe A, Smoot T, Zhang H, Johnson JD. Direct Contact with Mineral Trioxide

- Aggregate Activates and Differentiates Human Dental Pulp Cells. *J Endod.* 2011;37:1691–5.
123. Moussa SA. Mineral Trioxide Aggregate (MTA) vs Calcium Hydroxide in Direct Pulp Capping – Literature Review. *Online J Dent Oral Heal.* 2018;1:1–16.
 124. Morotomi T, Washio A, Kitamura C. Current and future options for dental pulp therapy. *Jpn Dent Sci Rev.* 2019;55:5–11.
 125. Zhou H, Shen Y, Wang Z, Li L, Zheng Y, Häkkinen L, Haapasalo M. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod.* 2013;39:478–83.
 126. Laurent P, Camps J, De Méo M, Déjou J, About I. Induction of specific cell responses to a Ca(3)SiO(5)-based posterior restorative material. *Dent Mater.* 2008;24:1486–94.
 127. Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J.* 2013;46:808–14.
 128. Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *J Endod.* 2012;38:1220–6.
 129. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF- β 1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J.* 2012;45:439–48.
 130. Akhlaghi N, Khademi A. Outcomes of vital pulp therapy in permanent teeth with different medicaments based on review of the literature. *Dent Res J (Isfahan).* 2015;12:406–17.
 131. Cushley S, Duncan HF, Lappin MJ, Chua P, Elamin AD, Clarke M, El-Karim IA. Efficacy of direct pulp capping for management of cariously exposed pulps in permanent teeth: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* 2021;54:556–71.
 132. Kunarti S. Pulp tissue inflammation and angiogenesis after pulp capping with transforming growth factor β 1. *Dent J (Majalah Kedokt Gigi).* 2008;41:88–90.
 133. Li F, Liu X, Zhao S, Wu H, Xu H. Porous chitosan bilayer membrane containing TGF- β 1 loaded microspheres for pulp capping and reparative dentin formation in a dog model. *Dent Mater.* 2014;30:172–81.
 134. Oliva-Rodríguez R, Pérez-Urizar J, Dibildox-Alvarado E, Martínez-Saldaña MC, Avelar-González FJ, Flores-Reyes H, Pozos-Guillén A de J, Guerrero-Barrera AL. Design of a controlled release system of OP-1 and TGF- β 1 based in microparticles of sodium alginate and release characterization by HPLC-UV. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2011;47:681–8.
 135. Hu CC, Zhang C, Qian Q, Tatum NB. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod.* 1998;24:744–51.
 136. Andelin WE, Shabahang S, Wright K, Torabinejad M. Identification of hard tissue after experimental pulp capping using dentin sialoprotein (DSP) as a marker. *J Endod.* 2003;29:646–50.
 137. Rutherford RB, Wahle J, Tucker M, Rueger D, Charette M. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol.* 1993;38:571–6.
 138. Rutherford RB, Gu K. Treatment of inflamed ferret dental pulps with recombinant bone morphogenetic protein-7. *Eur J Oral Sci.* 2000;108:202–6.
 139. Six N, Lasfargues JJ, Goldberg M. Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar pulp induced by recombinant human bone

- morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1). *Arch Oral Biol.* 2002;47:177–87.
140. Goldberg M, Six N, Decup F, Buch D, Soheili Majd E, Lasfargues JJ, Salih E, Stanislawski L. Application of bioactive molecules in pulp-capping situations. *Adv Dent Res.* 2001;15:91–5.
 141. Lovschall H, Fejerskov O, Flyvbjerg A. Pulp-capping with recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF-I) in rat molars. *Adv Dent Res.* 2001;15:108–12.
 142. Kikuchi N, Kitamura C, Morotomi T, Inuyama Y, Ishimatsu H, Tabata Y, Nishihara T, Terashita M. Formation of dentin-like particles in dentin defects above exposed pulp by controlled release of fibroblast growth factor 2 from gelatin hydrogels. *J Endod.* 2007;33:1198–202.
 143. HU JC-C, ZHANG C, YUN S-S, QIAN Q, RANLY DM. Platelet-Derived Growth Factor-BB and Epidermal Growth Factor as Pulp Capping Medicaments in Rat Incisors. *J hard tissue Biol.* 1997;6:121–9.
 144. Alsanea R, Ravindran S, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, George A. Biomimetic approach to perforation repair using dental pulp stem cells and dentin matrix protein 1. *J Endod.* 2011;37:1092–7.
 145. Kim J-H, Hong J-B, Lim B-S, Cho B-H. Histological evaluation of direct pulp capping with DSP-derived synthetic peptide in beagle dog. *J Korean Acad Conserv Dent.* 2009;34:120–9.
 146. Koike T, Polan MAA, Izumikawa M, Saito T. Induction of Reparative Dentin Formation on Exposed Dental Pulp by Dentin Phosphophoryn/Collagen Composite. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1–8.
 147. Smith HS, Soni NN. Histologic study of pulp capping in rat molars using calcitonin. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol.* 1982;53:311–7.
 148. Kline LW, Yu DC. Effects of calcitonin, calcitonin gene-related peptide, human recombinant bone morphogenetic protein-2, and parathyroid hormone-related protein on endodontically treated ferret canines. *J Endod.* 2009;35:866–9.
 149. Yun H-M, Chang S-W, Park K-R, Herr L, Kim E-C. Combined Effects of Growth Hormone and Mineral Trioxide Aggregate on Growth, Differentiation, and Angiogenesis in Human Dental Pulp Cells. *J Endod.* 2015;42:269–75.
 150. Nakamura Y, Hammarström L, Matsumoto K, Lyngstadaas SP. The induction of reparative dentine by enamel proteins. *Int Endod J.* 2002;35:407–17.
 151. Nakamura Y, Slaby I, Spahr A, Pezeshki G, Matsumoto K, Lyngstadaas SP. Ameloblastin fusion protein enhances pulpal healing and dentin formation in porcine teeth. *Calcif Tissue Int.* 2006;78:278–84.
 152. Songsiripradubboon S, Banlunara W, Sangvanich P, Trairatvorakul C, Thunyakitpisal P. Clinical, radiographic, and histologic analysis of the effects of acemannan used in direct pulp capping of human primary teeth: short-term outcomes. *Odontology.* 2016;104:329–37.
 153. Abo El-Mal EO, Abu-Seida AM, El Ashry SH. Biological evaluation of hesperidin for direct pulp capping in dogs' teeth. *Int J Exp Pathol.* 2021;102:32–44.
 154. Esmeraldo MRA, de Carvalho MGF, de Carvalho RA, de Freitas Lima R, de Brito Costa EMM. Inflammatory effect of green propolis on dental pulp in rats. *Braz Oral Res.* 2013;27:417–22.
 155. Parolia A, Kundabala M, Rao NN, Acharya SR, Agrawal P, Mohan M, Thomas M. A

- comparative histological analysis of human pulp following direct pulp capping with Propolis, mineral trioxide aggregate and Dycal. *Aust Dent J.* 2010;55:59–64.
156. Kitasako Y, Ikeda M, Tagami J. Pulpal responses to bacterial contamination following dentin bridging beneath hard-setting calcium hydroxide and self-etching adhesive resin system. *Dent Traumatol.* 2008;24:201–6.
157. Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *J Am Dent Assoc.* 1996;127:1491–4.
158. Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res.* 2004;83:590–5.
159. Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Lab Anim.* 2010;44:1–6.
160. Zivanovic S, Papic M, Vucicevic T, Miletic Kovacevic M, Jovicic N, Nikolic N, Milasin J, Paunovic V, Trajkovic V, Mitrovic S, Lukic ML, Lukic A, Ljujic B. Periapical lesions in two inbred strains of rats differing in immunological reactivity. *Int Endod J.* 2022;55:64–78.
161. Islam R, Toida Y, Chen F, Tanaka T, Inoue S, Kitamura T, Yoshida Y, Chowdhury AFMA, Ahmed HMA, Sano H. Histological evaluation of a novel phosphorylated pullulan-based pulp capping material: An in vivo study on rat molars. *Int Endod J.* 2021;54:1902–14.
162. Mashhadiabbas F, Dianat O, Motamedian SR, Saedi S, Ahangari Z. Histologic comparison of direct pulp capping of rat molars with MTA and different concentrations of simvastatin gel. *J Oral Sci.* 2018;60:57–63.
163. Kim DH, Jang JH, Lee BN, Chang HS, Hwang IN, Oh WM, Kim SH, Min KS, Koh JT, Hwang YC. Anti-inflammatory and Mineralization Effects of ProRoot MTA and Endocem MTA in Studies of Human and Rat Dental Pulp In Vitro and In Vivo. *J Endod.* 2018;44:1534–41.
164. Sela J, Ulmansky M. Reaction of normal and inflamed dental pulp to Calxyl and zinc oxide and eugenol in rats. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol.* 1970;30:425–30.
165. Minic S, Florimond M, Sadoine J, Valot-Salengro A, Chaussain C, Renard E, Boukpepsi T. Evaluation of pulp repair after biodentin full pulpotomy in a rat molar model of pulpitis. *Biomedicines.* 2021;9:1–17.
166. Hashemi-Beni B, Khoroushi M, Foroughi MR, Karbasi S, Khademi AA. Tissue engineering: Dentin – pulp complex regeneration approaches (A review). *Tissue Cell.* 2017;49:552–64.
167. Cheung RCF, Ng TB, Wong JH, Chan WY. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Mar Drugs.* 2015;13:5156–86.
168. Kogan P, He J, Glickman GN, Watanabe I. The Effects of Various Additives on Setting Properties of MTA. *J Endod.* 2006;32:569–72.
169. Manochefrifar H, Parirokh M, Kakoei S, Oloomi MM, Asgary S, Eghbal MJ, Mashhadi Abbas F. The effect of mineral trioxide aggregate mixed with chlorhexidine as direct pulp capping agent in dogs teeth: A histologic study. *Iran Endod J.* 2016;11:320–4.
170. Parirokh M, Asgary S, Eghbal MJ, Kakoei S, Samiee M. A comparative study of using a combination of calcium chloride and mineral trioxide aggregate as the pulp-capping

- agent on Dogs' teeth. *J Endod.* 2011;37:786–8.
171. Almeshari A, Khounganian R, Mahdi W, Aljarbou F, Bhandi S, Alsubait S. Pulpal response to the combined use of mineral trioxide aggregate and iloprost for direct pulp capping. *Appl Sci.* 2021;11:3702.
 172. Yoon J-H, Choi S-H, Koh J-T, Lee B-N, Chang H-S, Hwang I-N, Oh W-M, Hwang Y-C. Hard tissue formation after direct pulp capping with osteostatin and MTA in vivo. *Restor Dent Endod.* 2021;46:1–9.
 173. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med.* 2004;43:649–59.
 174. Suzuki N. Erythropoietin gene expression: developmental-stage specificity, cell-type specificity, and hypoxia inducibility. *Tohoku J Exp Med.* 2015;235:233–40.
 175. Ogunshola OO, Bogdanova AY. Epo and non-hematopoietic cells: What do we know? *Methods Mol Biol.* 2013;982:13–41.
 176. Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production. *J Physiol.* 2011;589:1251–8.
 177. Tóthová Z, Tomc J, Debeljak N, Solár P. Stat5 as a key protein of erythropoietin signalization. *Int J Mol Sci.* 2021;22:1–13.
 178. Tóthová Z, Šemeláková M, Solárová Z, Tomc J, Debeljak N, Solár P. The Role of PI3K/AKT and MAPK Signaling Pathways in Erythropoietin Signalization. *Int J Mol Sci.* 2021;22:7682.
 179. Lombardero M, Kovacs K, Scheithauer BW. Erythropoietin: A Hormone with Multiple Functions. *Pathobiology.* 2011;78:41–53.
 180. Suzuki N, Hirano I, Pan X, Minegishi N, Yamamoto M. Erythropoietin production in neuroepithelial and neural crest cells during primitive erythropoiesis. *Nat Commun.* 2013;4:2902.
 181. Weidemann A, Johnson RS. Nonrenal regulation of EPO synthesis. *Kidney Int.* 2009;75:682–8.
 182. Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem.* 1994;269:19488–93.
 183. Magnanti M, Gandini O, Giuliani L, Gazzaniga P, Marti HH, Gradilone A, Frati L, Aglianò AM, Gassmann M. Erythropoietin expression in primary rat Sertoli and peritubular myoid cells. *Blood.* 2001;98:2872–4.
 184. Dame C, Fahnenstich H, Freitag P, Hofmann D, Abdul-Nour T, Bartmann P, Fandrey J. Erythropoietin mRNA Expression in Human Fetal and Neonatal Tissue. *Blood.* 1998;92:3218–25.
 185. Conrad KP, Benyo DF, Westerhausen-Larsen A, Miles TM. Expression of erythropoietin by the human placenta. *FASEB J.* 1996;10:760–8.
 186. Rankin EB, Wu C, Khatri R, Wilson TLS, Andersen R, Araldi E, Rankin AL, Yuan J, Kuo CJ, Schipani E, Giaccia AJ. The HIF signaling pathway in osteoblasts directly modulates erythropoiesis through the production of EPO. *Cell.* 2012;149:63–74.
 187. Xu HL, Feng YP. Effects of 3-n-butylphthalide on production of vasoactive substances by cerebral and aortic endothelial cells. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 1999;20:929–33.
 188. Kimáková P, Solár P, Solárová Z, Komel R, Debeljak N. Erythropoietin and its angiogenic activity. *Int J Mol Sci.* 2017;18:19–22.
 189. Peng B, Kong G, Yang C, Ming Y. Erythropoietin and its derivatives: from tissue

- protection to immune regulation. *Cell Death Dis.* 2020;11:79.
190. Sorg H, Harder Y, Krueger C, Reimers K, Vogt PM. The Nonhematopoietic Effects of Erythropoietin in Skin Regeneration and Repair: From Basic Research to Clinical Use. *Med Res Rev.* 2013;33:637–64.
 191. Li D, Deng L, Xie X, Yang Z, Kang P. Evaluation of the osteogenesis and angiogenesis effects of erythropoietin and the efficacy of deproteinized bovine bone/recombinant human erythropoietin scaffold on bone defect repair. *J Mater Sci Mater Med.* 2016;27:101.
 192. Kertesz N, Wu J, Chen TH-P, Sucov HM, Wu H. The role of erythropoietin in regulating angiogenesis. *Dev Biol.* 2004;276:101–10.
 193. Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J, Liu X, Wu H, Carmichael ST. A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosci.* 2006;26:1269–74.
 194. Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell’Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood.* 1999;93:2627–36.
 195. Westenbrink BD, Oeseburg H, Kleijn L, van der Harst P, Belonje AMS, Voors AA, Schoemaker RG, de Boer RA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH. Erythropoietin stimulates normal endothelial progenitor cell-mediated endothelial turnover, but attributes to neovascularization only in the presence of local ischemia. *Cardiovasc drugs Ther.* 2008;22:265–74.
 196. Zhang L, Chopp M, Zhang RL, Wang L, Zhang J, Wang Y, Toh Y, Santra M, Lu M, Zhang ZG. Erythropoietin amplifies stroke-induced oligodendrogenesis in the rat. *PLoS One.* 2010;5:e11016.
 197. Cho YK, Kim G, Park S, Sim JH, Won YJ, Hwang CH, Yoo JY, Hong HN. Erythropoietin promotes oligodendrogenesis and myelin repair following lysolecithin-induced injury in spinal cord slice culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;417:753–9.
 198. Wan L, Zhang F, He Q, Tsang WP, Lu L, Li Q, Wu Z, Qiu G, Zhou G, Wan C. EPO Promotes Bone Repair through Enhanced Cartilaginous Callus Formation and Angiogenesis. *PLoS One.* 2014;9:e102010.
 199. Gong Q, Zeng J, Zhang X, Huang Y, Chen C, Quan J, Ling J. Effect of erythropoietin on angiogenic potential of dental pulp cells. *Exp Ther Med.* 2021;22:1–8.
 200. Brines M, Cerami A. The receptor that tames the innate immune response. *Mol Med.* 2012;18:486–96.
 201. Tsiftoglou AS. Erythropoietin (EPO) as a Key Regulator of Erythropoiesis, Bone Remodeling and Endothelial Transdifferentiation of Multipotent Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Implications in Regenerative Medicine. *Cells.* 2021;10:2140.
 202. Lisowska KA, Dębska-Ślizień A, Bryl E, Rutkowski B, Witkowski JM. Erythropoietin Receptor Is Expressed on Human Peripheral Blood T and B Lymphocytes and Monocytes and Is Modulated by Recombinant Human Erythropoietin Treatment. *Artif Organs.* 2010;654–62.
 203. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:643–51.

204. Inoue N, Takeuchi M, Ohashi H, Suzuki T. The production of recombinant human erythropoietin. *Biotechnol Annu Rev.* 1995;1:297–313.
205. Jelkmann W. Effects of Erythropoietin on Brain Function. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016;6:65–79.
206. Hamed S, Ullmann Y, Egozi D, Keren A, Daod E, Anis O, Kabha H, Belokopytov M, Ashkar M, Shofti R, Zaretsky A, Schlesinger M, Teot L, Liu PY. Topical Erythropoietin Treatment Accelerates the Healing of Cutaneous Burn Wounds in Diabetic Pigs Through an Aquaporin-3–Dependent Mechanism. *Diabetes.* 2017;66:2254–65.
207. Rezazadeh M, Jafari N, Akbari V, Amirian M, Tabbakhian M, Minaiyan M, Rostami M. A mucoadhesive thermosensitive hydrogel containing erythropoietin as a potential treatment in oral mucositis: in vitro and in vivo studies. *Drug Deliv Transl Res.* 2018;8:1226–37.
208. Nairz M, Schroll A, Moschen AR, Sonnweber T, Theurl M, Theurl I, Taub N, Jamnig C, Neurauter D, Huber LA, Tilg H, Moser PL, Weiss G. Erythropoietin Contrastingly Affects Bacterial Infection and Experimental Colitis by Inhibiting Nuclear Factor- κ B-Inducible Immune Pathways. *Immunity.* 2011;34:61–74.
209. Kuhrt D, Wojchowski DM. Emerging EPO and EPO receptor regulators and signal transducers. *Blood.* 2015;125:3536–41.
210. Siebert N, Xu W, Grambow E, Zechner D, Vollmar B. Erythropoietin improves skin wound healing and activates the TGF- β signaling pathway. *Lab Investig.* 2011;91:1753–65.
211. Uslu M, Kaya E, Yaykaşlı KO, Oktay M, Inanmaz ME, Işık C, Erdem H, Erkan ME, Kandış H. Erythropoietin stimulates patellar tendon healing in rats. *Knee.* 2015;22:461–8.
212. Xu X, Gu Z, Chen X, Shi C, Liu C, Liu M, Wang L, Sun M, Zhang K, Liu Q, Shen Y, Lin C, Yang B, Sun H. An injectable and thermosensitive hydrogel: Promoting periodontal regeneration by controlled-release of aspirin and erythropoietin. *Acta Biomater.* 2019;86:235–46.
213. Hamed S, Ullmann Y, Belokopytov M, Shoufani A, Kabha H, Masri S, Feldbrin Z, Kogan L, Kruchevsky D, Najjar R, Liu PY, Kerihuel J-C, Akita S, Teot L. Topical Erythropoietin Accelerates Wound Closure in Patients with Diabetic Foot Ulcers: A Prospective, Multicenter, Single-Blind, Randomized, Controlled Trial. *Rejuvenation Res.* 2021;24:251–61.
214. Bader A, Lorenz K, Richter A, Scheffler K, Kern L, Ebert S, Giri S, Behrens M, Dornseifer U, Macchiarini P, Machens H-G. Interactive role of trauma cytokines and erythropoietin and their therapeutic potential for acute and chronic wounds. *Rejuvenation Res.* 2011;14:57–66.
215. Hamed S, Bennett CL, Demiot C, Ullmann Y, Teot L, Desmoulière A. Erythropoietin, a novel repurposed drug: An innovative treatment for wound healing in patients with diabetes mellitus. *Wound Repair Regen.* 2014;22:23–33.
216. Sayan H, Ozacmak VH, Guven A, Aktas RG, Ozacmak ID. Erythropoietin stimulates wound healing and angiogenesis in mice. *J Invest Surg.* 19:163–73.
217. Buemi M, Vaccaro M, Sturiale A, Galeano MR, Sansotta C, Cavallari V, Floccari F, D’Amico D, Torre V, Calapai G, Frisina N, Guarneri F, Vermiglio G. Recombinant human erythropoietin influences revascularization and healing in a rat model of

- random ischaemic flaps. *Acta Derm Venereol.* 2002;82:411–7.
218. Li C, Shi C, Kim J, Chen Y, Ni S, Jiang L, Zheng C, Li D, Hou J, Taichman RS, Sun H. Erythropoietin promotes bone formation through EphrinB2/EphB4 signaling. *J Dent Res.* 2015;94:455–63.
219. Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Hurst V, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. Boutron I, editor. *PLOS Biol.* 2020;18:e3000411.
220. Chen J, Cui C, Qiao X, Yang B, Yu M, Guo W, Tian W. Treated dentin matrix paste as a novel pulp capping agent for dentin regeneration. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017;11:3428–36.
221. Liu S, Wang S, Dong Y. Evaluation of a Bioceramic as a Pulp Capping Agent in Vitro and in Vivo. *J Endod.* 2015;41:652–7.
222. Hiram-Bab S, Neumann D, Gabet Y. Erythropoietin in bone – Controversies and consensus. *Cytokine.* 2017;89:155–9.
223. Wang S, Zhang C, Li J, Niyazi S, Zheng L, Xu M, Rong R, Yang C, Zhu T. Erythropoietin protects against rhabdomyolysis-induced acute kidney injury by modulating macrophage polarization. *Cell Death Dis.* 2017;8:e2725.
224. Faquin WC, Schneider TJ, Goldberg MA. Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production. *Blood.* 1992;79:1987–94.
225. La Ferla K, Reimann C, Jelkmann W, Hellwig-Bürgel T. Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF-kappaB. *FASEB J.* 2002;16:1811–3.
226. Nagaya Y, Aoyama M, Tamura T, Kakita H, Kato S, Hida H, Saitoh S, Asai K. Inflammatory cytokine tumor necrosis factor α suppresses neuroprotective endogenous erythropoietin from astrocytes mediated by hypoxia-inducible factor-2 α . *Eur J Neurosci.* 2014;40:3620–6.
227. Costa E, Fernandes J, Ribeiro S, Sereno J, Garrido P, Rocha-Pereira P, Coimbra S, Catarino C, Belo L, Bronze-da-Rocha E, Vala H, Alves R, Reis F, Santos-Silva A. Aging is associated with impaired renal function, INF-gamma induced inflammation and with alterations in iron regulatory proteins gene expression. *Aging Dis.* 2014;5:356–65.
228. Cooper P, Smith AJ, Goldberg M. The Dental Pulp. Goldberg M, editor. *The Dental Pulp.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. 97–112 p.
229. Rombouts C, Giraud T, Jeanneau C, About I. Pulp Vascularization during Tooth Development, Regeneration, and Therapy. *J Dent Res.* 2017;96:137–44.
230. Zhao Y, Yuan X, Liu B, Tulu US, Helms JA. Wnt-Responsive Odontoblasts Secrete New Dentin after Superficial Tooth Injury. *J Dent Res.* 2018;97:1047–54.
231. Müller HD, Cvinkl B, Gruber R, Watzek G, Agis H. Prolyl hydroxylase inhibitors increase the production of vascular endothelial growth factor in dental pulp-derived cells. *J Endod.* 2012;38:1498–503.
232. Ricucci D, Siqueira JF, Li Y, Tay FR. Vital pulp therapy: histopathology and histobacteriology-based guidelines to treat teeth with deep caries and pulp exposure. *J*

- Dent. 2019;86:41–52.
233. Mateus V, Rocha J, Alves P, Mota-Filipe H, Sepodes B, Pinto RMA. Anti-Inflammatory Effect of Erythropoietin in the TNBS-induced Colitis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2017;120:138–45.
234. Elsally M, Azizieh F, Raghupathy R. Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *Int Endod J*. 2013;46:573–80.
235. Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: Players, rules and the games. *Immunology*. 2005;115:1–20.
236. Zhu X, Yuan Z, Yan P, Li Y, Jiang H, Huang S. Effect of iRoot SP and mineral trioxide aggregate (MTA) on the viability and polarization of macrophages. *Arch Oral Biol*. 2017;80:27–33.
237. Silva MJB, Vieira LQ, Sobrinho APR. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2008;105:70–6.
238. Zakharova M, Ziegler HK. Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF-alpha: inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells. *J Immunol*. 2005;175:5024–33.
239. Brodbeck WG, Voskerician G, Ziats NP, Nakayama Y, Matsuda T, Anderson JM. In vivo leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials are dependent on surface chemistry. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2003;64:320–9.
240. Cavalcanti BN, de Mello Rode S, França CM, Marques MM. Pulp capping materials exert an effect on the secretion of IL-1 β and IL-8 by migrating human neutrophils. *Braz Oral Res*. 2011;25:13–8.
241. Tavares WLF, De Brito LCN, Henriques LCF, Teles FRF, Teles RP, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. Effects of calcium hydroxide on cytokine expression in endodontic infections. *J Endod*. 2012;38:1368–71.
242. Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 1998;24:543–7.
243. Zhang J, Zou YR, Zhong X, Deng HDF, Pu L, Peng K, Wang L. Erythropoietin pretreatment ameliorates renal ischaemia-reperfusion injury by activating PI3K/Akt signalling. *Nephrology*. 2015;20:266–72.
244. Yang B, Hosgood SA, Bagul A, Waller HL, Nicholson ML. Erythropoietin regulates apoptosis, inflammation and tissue remodelling via caspase-3 and IL-1 β in isolated hemoperfused kidneys. *Eur J Pharmacol*. 2011;660:420–30.
245. Yang C, Zhang Y, Wang J, Li L, Wang L, Hu M, Xu M, Long Y, Rong R, Zhu T. A novel cyclic helix B peptide inhibits dendritic cell maturation during amelioration of acute kidney graft rejection through Jak-2/STAT3/SOCS1. *Cell Death Dis*. 2015;6:e1993.
246. Kaiser K, Texier A, Ferrandiz J, Buguet A, Meiller A, Latour C, Peyron F, Cespuoglio R, Picot S. Recombinant human erythropoietin prevents the death of mice during cerebral malaria. *J Infect Dis*. 2006;193:987–95.
247. Strunk T, Härtel C, Temming P, Matzke N, Zimmer J, Schultz C. Erythropoietin inhibits cytokine production of neonatal and adult leukocytes. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2008;97:16–20.

248. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2011;1813:878–88.
249. Yamanaka Y, Kaneko T, Yoshiba K, Kaneko R, Yoshiba N, Shigetani Y, Nör JE, Okiji T. Expression of angiogenic factors in rat periapical lesions. *J Endod.* 2012;38:313–7.
250. de Brito LCN, Teles FRF, Teles RP, Totola AH, Vieira LQ, Sobrinho APR. T-lymphocyte and cytokine expression in human inflammatory periapical lesions. *J Endod.* 2012;38:481–5.
251. Sarica S, Altun I. The effects on peripheral nerve damage of the application of local and systemic erythropoietin. *Bratislava Med J.* 2018;119:602–7.
252. Wattanapakkavong K, Srisuwan T. Release of Transforming Growth Factor Beta 1 from Human Tooth Dentin after Application of Either ProRoot MTA or Biodentine as a Coronal Barrier. *J Endod.* 2019;45:701–5.
253. Purroy C, Fairchild RL, Tanaka T, Baldwin WM, Manrique J, Madsen JC, Colvin RB, Alessandrini A, Blazar BR, Fribourg M, Donadei C, Maggiore U, Heeger PS, Cravedi P. Erythropoietin receptor-mediated molecular crosstalk promotes T cell immunoregulation and transplant survival. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28:2377–92.
254. Mihmanli A, Dolanmaz D, Avunduk MC, Erdemli E. Effects of Recombinant Human Erythropoietin on Mandibular Distraction Osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67:2337–43.
255. Holstein JH, Orth M, Scheuer C, Tami A, Becker SC, Garcia P, Histing T, Mörsdorf P, Klein M, Pohlemann T, Menger MD. Erythropoietin stimulates bone formation, cell proliferation, and angiogenesis in a femoral segmental defect model in mice. *Bone.* 2011;49:1037–45.
256. Chang SW, Bae WJ, Yi JK, Lee S, Lee DW, Kum KY, Kim EC. Odontoblastic Differentiation, Inflammatory Response, and Angiogenic Potential of 4 Calcium Silicate-based Cements: Micromega MTA, ProRoot MTA, RetroMTA, and Experimental Calcium Silicate Cement. *J Endod.* 2015;41:1524–9.
257. Liu Q, Ma Y, Wang J, Zhu X, Yang Y, Mei Y. Demineralized bone matrix used for direct pulp capping in rats. *PLoS One.* 2017;12:1–13.
258. Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of Mineralization Markers in Dental Pulp Cells. *J Endod.* 2007;33:703–8.
259. Paranjpe A, Zhang H, Johnson JD. Effects of Mineral Trioxide Aggregate on Human Dental Pulp Cells after Pulp-capping Procedures. *J Endod.* 2010;36:1042–7.
260. Wang L, Wu F, Song Y, Duan Y, Jin Z. Erythropoietin induces the osteogenesis of periodontal mesenchymal stem cells from healthy and periodontitis sources via activation of the p38 MAPK pathway. *Int J Mol Med.* 2018;41:829–35.
261. Inchingolo F, Marrelli M, Annibali S, Cristalli MP, Dipalma G, Inchingolo AD, Palladino A, Inchingolo AM, Gargari M, Tatullo M. Influence of endodontic treatment on systemic oxidative stress. *Int J Med Sci.* 2013;11:1–6.
262. Li X, Hu L, Ma L, Chang S, Wang W, Feng Y, Xu Y, Hu J, Zhang C, Wang S. Severe periodontitis may influence cementum and dental pulp through inflammation, oxidative stress, and apoptosis. *J Periodontol.* 2019;90:1297–306.
263. Leite MF, Lima AM, Otton R. Combination of astaxanthin and fish oil

- supplementation alters antioxidant enzyme profile of dental pulp tissue. *Int Endod J*. 2012;45:1109–15.
264. Vengerfeldt V, Mändar R, Saag M, Piir A, Kullisaar T. Oxidative stress in patients with endodontic pathologies. *J Pain Res*. 2017;10:2031–40.
265. D’Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Patel K, Suvan J, Donos N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J Dent Res*. 2010;89:1241–6.
266. Alaçam A, Tulunoglu Ö, Oygür T, Bilici S. Effects of topical Catalase application on dental pulp tissue: A histopathological evaluation. *J Dent*. 2000;28:333–9.
267. Yeung SY, Huang CS, Chan CP, Lin CP, Lin HN, Lee PH, Jia HW, Huang SK, Jeng JH, Chang MC. Antioxidant and pro-oxidant properties of chlorhexidine and its interaction with calcium hydroxide solutions. *Int Endod J*. 2007;40:837–44.
268. Sanchez MC, Lancel S, Boulanger E, Nevriere R. Targeting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the treatment of impaired wound healing: A systematic review. *Antioxidants*. 2018;7:1–14.
269. Grossi GB, Borrello S, Giuliani M, Galeotti T, Miani C. Copper-zinc superoxide dismutase in human and animal dental pulp. *J Dent*. 1991;19:319–21.
270. Bailey DM, Lundby C, Berg RMG, Taudorf S, Rahmouni H, Gutowski M, Mulholland CW, Sullivan JL, Swenson ER, McEneny J, Young IS, Pedersen BK, Møller K, Pietri S, Culcasi M. On the antioxidant properties of erythropoietin and its association with the oxidative-nitrosative stress response to hypoxia in humans. *Acta Physiol (Oxf)*. 2014;212:175–87.
271. Katavetin P, Tungsanga K, Eiam-Ong S, Nangaku M. Antioxidative effects of erythropoietin. *Kidney Int*. 2007;72.
272. Zheng DH, Han ZQ, Wang XX, Ma D, Zhang J. Erythropoietin attenuates high glucose-induced oxidative stress and inhibition of osteogenic differentiation in periodontal ligament stem cell (PDLSCs). *Chem Biol Interact*. 2019;305:40–7.

БИОГРАФИЈА

Др Милош Папић рођен је 12.03.1992. године у Крагујевцу, Република Србија. Завршио је Медицинску школу са домом ученика "Сестре Нинковић" у Крагујевцу, смер зубни техничар, 2010. године. Факултет медицинских наука у Крагујевцу, Интегрисане академске студије стоматологије, уписао је школске 2010/2011. године, а дипломирао 2015. године са просечном оценом 9,55 (девет и 55/100) и као најбољи дипломац у својој генерацији стекао звање доктора стоматологије. Током школске 2014/2015. године био је стипендиста фонда за младе таленте Р. Србије „Доситеја“, Министарства омладине и спорта. Добитник награде „Српског лекарског друштва“ за најбоље дипломираног студента на студијама стоматологије у 2015. години. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу уписао је школске 2015/2016. године, изборно подручје, Истраживања у стоматологији. Специјалистичке студије из здравствене области Болести зуба и ендодонција уписао је 2017. године. и завршио 2021. године чиме је стекао звање специјалисте Болести зуба и ендодонције. Од 2016. године запослен је на Факултету медицинских наука у звању сарадника у настави, а од 2021. године у звању асистента за ужу научну област Болести зуба и ендодонција.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Милош Папић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

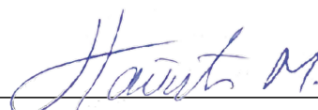
Терапијски ефекти еритропоетина у директном прекривању инфламиране зубне пулпе

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, _____, _____ 2022. године,



потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

Терапијски ефекти еритропоетина у директном прекривању инфламиране зубне
пулпе

истоветне.

У Крагујевцу _____, _____ 2022. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Милош Папић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Терапијски ефекти еритропоетина у директном прекривању инфламиране зубне пулпе

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

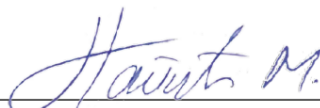
не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу _____, _____ 2022. године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>