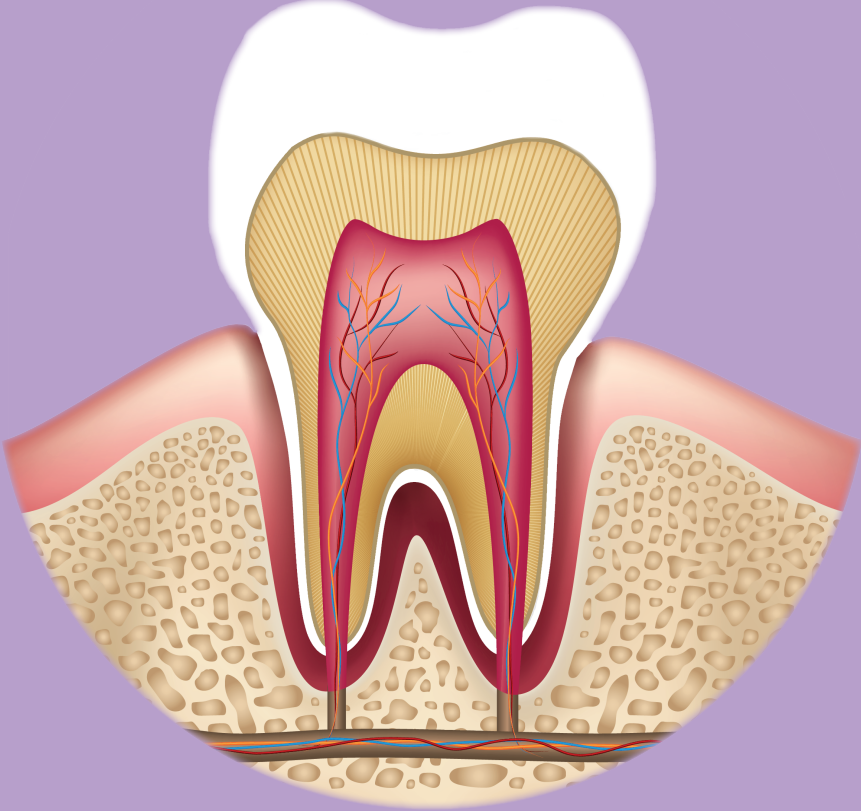


# Examination of dental tissue and evaluation of follow-up methods in TEM

BÜŞRA DEVECİ

İŞILAY SEZEN ERMİŞ

İLHAN ÖZDEMİR



# Examination of dental tissue and evaluation of follow-up methods in TEM

Büşra DEVECİ<sup>1</sup>, Işlay Sezen ERMiŞ<sup>2</sup>, İlhan ÖZDEMİR<sup>3</sup>



---

<sup>1</sup> Dicle University Faculty of Dentistry, Dentistry Clinic, Diyarbakır, Turkey. 0000-0002-3023-1729, bsradeveci@gmail.com, 05379805070

<sup>2</sup> Harran University Faculty of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Şanlıurfa, Turkey. 000-00029714-4670, sezenermis@msn.com, 0537 980 50 70

<sup>3</sup> Private Buhara Hospital, Gynecology and Obstetrics Clinic IVF Center, Erzurum, Turkey. 0000-0001-9957-0211, ilhanozdemir25@yandex.com, +905054038111

Copyright © 2022 by iksad publishing house

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, distributed or transmitted in any form or by any means, including photocopying, recording or other electronic or mechanical methods, without the prior written permission of the publisher, except in the case of brief quotations embodied in critical reviews and certain other noncommercial uses permitted by copyright law.

Institution of Economic Development and Social Researches Publications®

(The Licence Number of Publicator: 2014/31220)

TURKEY TR: +90 342 606 06 75

USA: +1 631 685 0 853

E mail: iksadyayinevi@gmail.com

www.iksadyayinevi.com

It is responsibility of the author to abide by the publishing ethics rules. The first degree responsibility of the works in the book belongs to the authors.

Iksad Publications – 2022©

**ISBN: 978-625-8213-54-6**

Cover Design: Ibrahim KAYA

September / 2022

Ankara / Turkey

Size = 16x24 cm

## **ÖN SÖZ**

Dental pulpa kök hücreleri (DPSC'ler) rejeneratif tıp temelli tedaviler için giderek daha fazla savunulmaktadır. Bununla birlikte, DPSC alt popülasyonlarının genotipik / fenotipik özelliklerinde, terapötik potansiyellerini etkileyen önemli heterojenite mevcuttur. Çoğu çalışma, 2D kültür yaklaşımlarını kullanarak DPSC heterojenliğini oluşturduğundan, heterojen DPSC proliferatif ve kasılma / yeniden modelleme yeteneklerinin, in vitro olarak 3D tip I kolajen jellerde daha da belirgin olup olmadığını araştırılmıştır. Yetişkin insan diş özü kök hücreleri (DPSC'ler), klinik kullanım için etkili rejeneratif tıp temelli tedavilerin geliştirilmesinde canlı bir mezenkimal kök hücre (MSC) kaynağı olarak giderek daha fazla karakterize edilmekte ve değerlendirilmektedir. Bu kitapta yapılan değerlendirmeler neticesinde diş dokusunun TEM 'deki metodların değerlendirmesi ve araştırması yapılmıştır.



## İÇİNDEKİLER

ÖN SÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER .....	iii
GİRİŞ .....	5
3D Tip I Kollajen Jellerin Hazırlanması ve Kültürü;.....	10
Aselüler Kollajen Jellerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi; .....	11
Kollajen Jellerde DPSC Morfolojilerinin SEM ve Floresans Mikroskobu Analizi .....	11
Aselüler Kollajen Jellerin SEM Analizi .....	12
Tip I Kollajen Jellerde DPSC Morfolojileri .....	13
HDPSC morfolojisi ve yapışmasının değerlendirilmesi.....	16
Transmisyon elektron mikroskobu elektron mikroskobu (TEM) .....	28
Diş pulpası hücrelerinin in vitro farklılaşma potansiyelinin karakterizasyonu.....	29
LTA ve LPS ile farklı günlerde stimülasyonu takiben hücre durumu ..	30
Dental pulpa hücrelerinin ultrastrüktürel ve elektron mikroskobik özellikleri.....	32
Diş Pulpasından Elde Edilen Ekzozomların Karakterizasyonu .....	36
HBMMSK'ler Tarafından Etiketli Ekzozomların Alımı .....	38
Taramalı Elektron Mikroskobu .....	52
Işık Mikroskobu ve Geçirimli Elektron Mikroskobu .....	53
Elektron mikroskob ve immünohistokimya .....	67
İmmünohistokimyasal kontroller .....	69
KAYNAKLAR .....	70



## GİRİŞ

Dental pulpa kök hücreleri (DPSC'ler) rejeneratif tıp temelli tedaviler için giderek daha fazla savunulmaktadır. Bununla birlikte, DPSC alt popülasyonlarının genotipik / fenotipik özelliklerinde, terapötik potansiyellerini etkileyen önemli heterojenite mevcuttur. Çoğu çalışma, 2D kültür yaklaşımlarını kullanarak DPSC heterojenliğini oluşturduğundan, heterojen DPSC proliferatif ve kasılma / yeniden modelleme yeteneklerinin, in vitro olarak 3D tip I kolajen jellerde daha da belirgin olup olmadığını araştırdık . DPSC alt popülasyonları, insan üçüncü azı dişlerinden izole edildi ve in vitro takiben yüksek / düşük proliferatif ve multipotent / unipotent olarak tanımlandıkültür genişlemesi ve popülasyon ikiye katlama (PD) analizi. A3 (30 PD ve 80 PD) gibi yüksek proliferatif / multipotent DPSC'ler ve A1 (17 PD'ler) gibi düşük proliferatif / unipotent DPSC'ler, çevreleyen kültür plastiğine takılı veya ondan ayrılmış olarak 12 gün boyunca kolajen jellerde kültürlenmiştir. Kollajen mimarisi ve yüksek proliferatif / multipotent DPSC morfolojileri, Taramalı Elektron Mikroskobu ve FITC-phalloidin / Floresan Mikroskobu ile görselleştirildi. Kolajen jellerin DPSC proliferasyonu (hücre sayımları), kontraksiyonu (% çap azalmaları) ve yeniden şekillenmesi (MMP-2 / MMP-9 jelatin zimografisi) de değerlendirildi. A3 (80 PD) tepkileri önemli ölçüde azalmış olmasına rağmen, beklenmedik bir şekilde DPSC'ler, A3 (30 PD) ve A1 (17 PD) arasında hiçbir çoğalma farklılığı mevcut değildi. A3 (30 PD) ile hızlı ayrılan kolajen jel kasılmasına rağmen, A1 (17 PD) ile benzer kasılma oranları belirlendi, ancak A3 (80 PD) kasılması



önemli ölçüde bozuldu. Jel kasılması, farklı jelatinaz profilleri ile ilişkiliydi. A3 (30 PD), üstün MMP-9'a ve A1'e (17 PD) benzer MMP-2 aktivitelere sahipken A3 (80 PD), MMP-2 / MMP-9'u önemli ölçüde azaltmıştır. Yüksek proliferatif / multipotent DPSC'ler, A3 (30 PD) ayrıca, bağlanan jeller içinde poligonal hale gelen fibroblast benzeri morfolojiler sergilerken, ayrılmış jellerde sitoskeletal organizasyonu ve fibroblastik morfolojileri kaybetti. Bu çalışma, DPSC'lerin jel kasılması ve MMP ekspresyon / aktivite yeteneklerinde heterojenliğin var olduğunu, potansiyel olarak biyomateryal yapı iskeletlerini bozma ve 3B ortamlarda hücresel işlevleri ve genel olarak rejeneratif özelliklerini düzenleme yeteneklerindeki farklılıkları yansıttığını göstermektedir.

Yetişkin insan diş özü kök hücreleri (DPSC'ler), klinik kullanım için etkili rejeneratif tıp temelli tedavilerin geliştirilmesinde canlı bir mezenkimal kök hücre (MSC) kaynağı olarak giderek daha fazla karakterize edilmekte ve değerlendirilmektedir [1,2]. Bu tür sonuçlar, kemik iliği için oluşturulmuş olanlarla karşılaştırılabilir, kendi kendini yenileme, klonojenik ve çok soylu (örn., Osteojenik, kondrojenik, adipojenik, miyojenik ve nörojenik) farklılaşma yeteneklerine ek olarak kalıcı diş yapısından kolayca erişilebilir olan DPSC'lere dayanmaktadır. türevi MSC'ler [3]. Sonuç olarak, DPSC'lerin in vivo çeşitli hayvan modeli kusurlarına transplantasyonu takiben onarım için faydalı olduğu zaten gösterilmiştir. Diş Hekimliği, Ortopedi, Nöroloji, Oftalmoloji ve Kardiyoloji gibi klinik alanlardaki hastalıklar ve travmalarla ilgilidir. MSC popülasyonlarını yenilemek ve de novo doku

onarımını kolaylaştırmak için , eksojen kaynaklı MSC'ler, hücre taşıyıcıları olarak hareket eden ve mekanik destek sağlayan üç boyutlu (3D) biyomateryal iskeleler veya hidrojeller içinde tohumlanan yara bölgelerine her zaman nakledilir. Ayrıca, şu anda kullanılan sentetik, yarı sentetik ve doğal olarak türetilmiş iskele malzemelerinin bolluğu, MSC kendini yenilemesini, çoğalmasını, göçünü aktif olarak kontrol eden doğal kök hücre niş mikro ortamını içeren hücre dışı matrisin (ECM) fizyokimyasal özelliklerini özetlemeye çalışmaktadır. farklılaşma yanıtları [4]. İskele tabanlı 3B montajlar, hücre sinyallemesi, mekanik kuvvet iletimi ve biyomateryale yapışmaya ek olarak hücre iskeleti organizasyonunu ve hücre morfolojiyi düzenleyen integrin tabanlı odak yapışmaları ve Rho GTPazlar aracılığıyla MSC'lerle çoklu hücrel etkileşimlere izin veren mekansal bir düzenleme sağlar. substratum [5]. Doğal ve yarı sentetik biyomateryal yapı iskeletlerinin çoğu, yeni sentezlenen doku ile değiştirilmek üzere, aynı zamanda MSC aktivitesini desteklemede işlevsel bir rol sağlamak üzere, MMP-2 ve MMP-9 gibi matris metaloproteinazlar (MMP'ler) tarafından kademeli yeniden modellenme ve bozunmaya uğrayacak şekilde tasarlanmıştır [6,7]. Bu tür ilerlemelere rağmen, proliferasyon ve farklılaşma yeteneklerinde büyük farklılıklar gösteren bireysel alt popülasyonlarla dental pulpa dokularından izole edilen DPSC'ler arasındaki önemli heterojenite nedeniyle klinik uygulamalar için DPSC tabanlı tedavilerin geliştirilmesinde temel zorluklar devam etmektedir [8]. Sonuç olarak, heterojen DPSC popülasyonlarının in vitro > 120 popülasyon ikiye katlanmasına (PD) ulaşmasına rağmen , saflaştırılmış DPSC'lerin

yalnızca% 20'si> 20 PD'yi çoğaltma kapasitesine sahiptir. Bu tür özelliklerin, MSC tabanlı tedavilerin önemli bir kısıtlaması, in vitro kapsamlı sonuçta proliferatif düşüşe, replikatif yaşlanmaya ve bozulmuş MSC rejeneratif özelliklerine yol açan klinik kullanım için yeterli hücre sayısını üretmek için gerekli olan genişleme [9]. Yapılan son araştırmalar, yüksek proliferatif DPSC'lerin kültürde > 80 PD kapasitesine sahipken, düşük proliferatif DPSC'lerin yaşlanmadan önce yalnızca <40 PD'yi tamamladığını, daha az proliferatif alt popülasyonlardan daha uzun telomerlere sahip yüksek proliferatif kapasiteye sahip DPSC'ler ile korelasyon içinde olduğunu göstermiştir [10,11]. Düşük proliferatif DPSC yaşlanması, aynı zamanda, kök hücre belirteci özelliklerinin kaybı ve bozulmuş osteojenik / kondrojenik farklılaşma ile ilişkilendirilerek adipojenez lehine olmuştur. Bunun aksine, yüksek proliferatif DPSC'ler, yalnızca uzun süreli in vitro genişlemeyi (> 60 PD) takiben bozulmuş farklılaşma göstererek, çok potansiyel yeteneklerini korudu. Bu nedenle, daha önce yüksek proliferatif / multipotent ve düşük proliferatif / unipotent DPSC alt popülasyonları arasında var olduğu gösterilen yerleşik genotipik ve fenotipik heterojenlik nedeniyle, 2D tek tabakalı kültürleri kullanan bu çalışma, benzer DPSC heterojenliğinin kendi çoğalmaları ve yeniden modelleme yetenekleri açısından var olup olmadığını araştırmıştır. in vitro 3 boyutlu tip I kolajen jelleri sözleşmeli. Spesifik olarak, yüksek proliferatif / multipotent DPSC alt popülasyonunun, A3'ün proliferatif ve ECM kasılma / yeniden modelleme yetenekleri, proliferatif yaşam süresinde erken (sensescent olmayan) aşamalarda (30 PD'de) ve daha sonra (yaklaşan yaşlanma) aşamalarında (80 PD'de) değerlendirildi. ve

yaşlanmaya yaklaşan düşük proliferatif / unipotent DPSC, A1 ile karşılaştırıldı (17 PD'de). Rejeneratif tıp uygulamaları için doğal biyomateryal yapı iskeletlerinin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanıldığından Tip I kollajen jeller kullanıldı [12]. DPSC'ler tercihli olarak seçilmiş ve diferansiyel fibronektin adezyon testi ile hücre süspansiyonlarından izole edilmiş diş pulpa dokularının tek hücreli süspansiyonları elde edilmiştir [11]. İzole edilmiş hücreler, hücre yüzey markörü ekspresyonu yoluyla DPSC'ler olarak doğrulandı (MSC markörleri, CD73, CD90 ve CD105 için pozitif, hematopoietik kök hücre markörü, CD45 için negatif). DPSC'ler daha sonra, yüksek veya düşük proliferatif ve çoklu veya tek kutuplu olarak genişletilmiş kültür genişlemesi ve karakterizasyonuna maruz kaldı. Proliferasyon analizi, yaşlanmadan önce her bir DPSC alt popülasyonunun ulaştığı PD'lere dayanıyordu ve azaltılmış telomer uzunlukları, pozitif yaşlanma ile ilişkili  $\beta$  - galaktosidaz boyaması ve artmış p53, p21 waf1 dahil olmak üzere diğer yaşlanma ile ilişkili belirteçlerin saptanmasıyla doğrulanmıştır.ve p16 INK4a ifadesi [11]. Farklılaşma analizleri, her DPSC alt popülasyonunun, daha önce tarif edildiği gibi yerleşik farklılaşma belirteçlerinin saptanması yoluyla osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşmaya uğrama yeteneklerine dayandırıldı. Bireysel DPSC alt popülasyonlarının daha sonra yüksek proliferatif / multipotent DPSC'ler (A3 gibi, > 80 PD kapasitesine sahip) veya düşük proliferatif / unipotent DPSC'ler (A1 gibi, <40 PD kapasitesine sahip) olduğu doğrulandı.

### 3D Tip I Kollajen Jellerin Hazırlanması ve Kültürü;

DPSC'ler, Stephens ve diğerlerinin yöntemine göre tip I kolajen jellerde tohumlandı. [13]. Tip I sıçan kuyruğu kolajeni ( $> 2 \text{ mg / mL}$ , First Link, Wolverhampton, UK), ribonükleositler ve deoksiribonükleositler içeren,  $4 \text{ mM L-glutamin}$ ,  $100 \text{ U / mL}$  ile desteklenmiş bir  $\alpha$ -modifiye edilmiş Minimum Temel Ortamda ( $\alpha \text{ MEM}$ ) yeniden oluşturuldu.  $\text{mL}$  penisilin G sodyum,  $0,1 \text{ } \mu\text{g / mL}$  streptomisin sülfat,  $0,25 \text{ } \mu\text{g / mL}$  amfoterisin (tümü ThermoFisher Scientific, Paisley, UK) ve  $100 \text{ } \mu\text{M}$  L-askorbat 2-fosfat (Sigma, Poole, İngiltere),  $1 \text{ mg / mL}$  solüsyon sağlamak için. Kolajen çözeltileri, damla damla  $5 \text{ M}$  sodyum hidroksit ilave edilerek nötralize edildi. Daha sonra, kolajen çözeltilerinin alikoları ( $1 \text{ mL}$ ) her bir 12-çukurlu plaka içinde ilave edildi ve  $37 \text{ }^\circ\text{C} / \% 5 \text{ CO}$  tutulmuştur 2 45 dakika karıştırıldı. Proliferatif yaşam sürelerinde erken (sensescent, 30 PD) ve geç (yaklaşan yaşlanma, 80 PD) aşamalarında yüksek proliferatif / multipotent DPSC alt popülasyonları ve düşük proliferatif / unipotent DPSC'ler, A1 (yaklaşan yaşlanma, 17 PD) askıya alındı içinde  $\alpha 20\%$  jelatinaz içermeyen fetal dana serumu ihtiva eden MEM (FCS, ThermoFisher Scientific, uygun komple FCS hazırlanan [14]. DPSC'ler ( $5 \times 10^4$  jelatinaz içermeyen  $\alpha \text{ MEM}$  içindeki hücre /  $\text{mL}$ ) daha sonra kolajen jellere eklenmiştir. Kolojen j eller, ( $n \text{ DPSC}$  alt popülasyonununun ortalama = 3)  $37 \text{ }^\circ\text{C} / \% 5$  'de muhafaza edilmiştir 2 jeller ya da çevreleyen doku kültür plastiğe yapıştırılmış ya da steril bir filtre ucunu kullanarak Gün 0 müstakil kalan ile, 12 gün boyunca uygulanır. Aselüler tip I kolajen jeller de kontroller olarak oluşturuldu.

## **Aselüler Kolajen Jellerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi;**

Aselüler jeller içindeki tip I kolajen liflerinin mimarisi Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile değerlendirildi. Aselüler kollajen jeller, yukarıda tarif edildiği gibi oluşturuldu ve oda sıcaklığında 2 saat 0.1 M kakodilat tamponu içerisinde% 2.5 glutaraldehit (Agar Scientific, Stansted, UK) ile sabitlendi. Jeller daha sonra 0.1 M kakodilat tamponu ile yıkandı (x3) ve dereceli bir etanol serisi ile dehidre edildi: her biri 15 dakika boyunca% 30,% 50,% 70 ve% 100 ve jeller gece boyunca kurumaya bırakıldı. Kurutulmuş hidrojeller püskürtmeyle kaplandı ve 10 kV'de çalıştırılan bir S4800 Taramalı Elektron Mikroskobu (Hitachi, Tokyo, Japonya) kullanılarak her jelde birçok yerde SEM görüntüleri alındı.

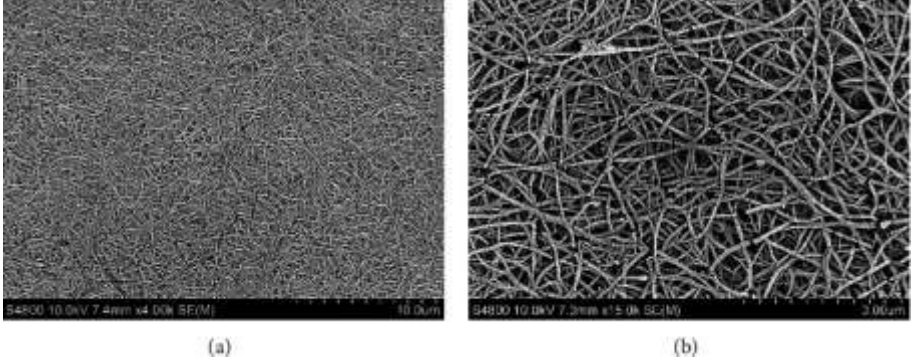
## **Kolajen Jellerde DPSC Morfolojilerinin SEM ve Floresans Mikroskobu Analizi**

Tip I kollajen jellerde sensesan (30 PD), yüksek proliferatif / multipotent DPSC alt popülasyonu A3'ün hücresel morfolojileri hem SEM hem de FITC-falloidin ve Floresan Mikroskobu kullanılarak aktin hücre iskeleti boyama yoluyla incelendi. DPSC-tohumlanmış kolajen jeller, yukarıda anlatıldığı gibi oluşturulmuştur. SEM için, kolajen jeller, yukarıda ayrıntılı olarak açıklanan yöntemlere göre sabitlendi, işlendi ve görselleştirildi. Floresan Mikroskopi için, DPSC-tohumlanmış kollajen jeller, fosfat tamponlu salin (PBS, 1x1 mL) ile yıkandı ve% 4 paraformaldehit (1 mL, Santa Cruz, Dallas, ABD) ile oda sıcaklığında 10 dakika sabitlendi. Jeller, 5 dakika aralıklarla PBS

(2x1 mL) ile yıkandı ve% 0.3 Triton X-100 (1 mL) ile 30 dakika boyunca oda sıcaklığında sabit çalkalama altında işlemden geçirildi. Jeller, Tris tamponlu salin (TBS, pH 7.5, 2x1 mL) ve TBS (% 1 BSA-TBS) içinde% 1 sığır serum albümini (BSA, Fraksiyon V, ThermoFisher Scientific) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında sabit çalkalama altında bloke edildi. DPSC tohumlanmış jeller, FITC-phalloidin (20 µg / mL, 1 mL, Sigma)% 1 BSA-TBS içinde ve 4 ° C'de karanlıkta ve sürekli çalkalama altında 1 saat inkübe edildi. Jeller, 5 dakika aralıklarla TBS (2x1 mL) ile yıkandı ve Floresan Mikroskopi (Olympus Provis AX70 Mikroskobu, Olympus UK Ltd., Southend-on-Sea, İngiltere) ile görüntü alındı.

### **Aselüler Kolajen Jellerin SEM Analizi**

Yukarıda açıklanan protokoller kullanılarak oluşturulan aselüler kollajen jellerin temsili SEM görüntüleri Şekillerde gösterilmektedir. 1 A) ve 1 (b). Matriks mimarisi, dar, uzun ve çapraz bağlanmış kollajen liflerinden oluşan yoğun bir fibriler ağın oluşumu ile bu yapıdaki tip I kollajen jeller için tipiktir [15]. Sonuç olarak, üretilen kolajen elyaf düzenlemeleri, genel olarak kolajen jeller içinde nispeten küçük gözenek boyutlarının oluşmasına neden oldu.



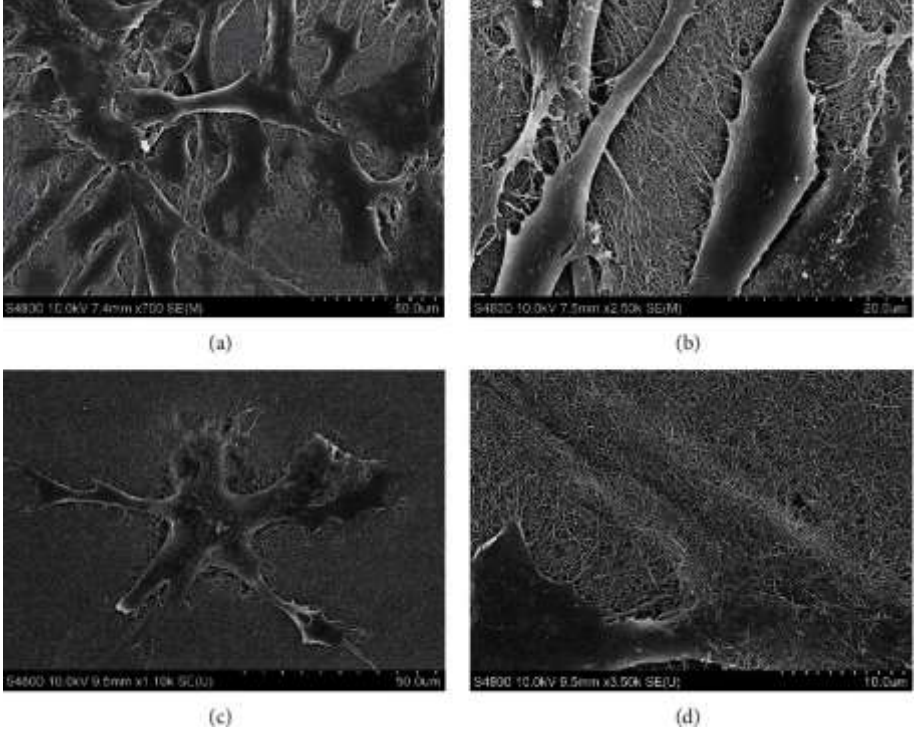
**Şekil 1:** Burada açıklanan protokoller kullanılarak oluşturulan aselüler tip I kolajen jellerin SEM görüntüleri (a)  $\times 4,000$  ve (b)  $\times 15,000$  büyütme [16].

### **Tip I Kolajen Jellerde DPSC Morfolojileri**

Hızlı ayrılan kollajen jel kasılmasının ve sensesent olmayan (30 PD), yüksek proliferatif / multipotent DPSC alt popülasyonunun, A3'ün benzersiz MMP-9 ekspresyon / aktivite özelliklerinin bir sonucu olarak, bu alt popülasyonun hücre morfolojileri, tip I kollajen jellerde ayrıca incelenmiştir. SEM ve Floresan Mikroskobu tarafından. SEM analizi, DPSC'lerin, 12 günlük kültür süresi boyunca tespit edilebilen canlı hücreler ile genel olarak kolajen jeller ile iyi bir biyouyumluluğa sahip olduğunu gösterdi. DPSC'lerin kolajen liflerine bağlandığı ve 1. Günde yayılmaya başladığı, DPSC'lerin genel olarak düzleştirilmiş, iğ şeklinde veya poligonal morfolojiler sergilediği gösterilmiştir (Şekiller5 (a) ve 5 (b)). 12. Günde DPSC'ler, hücre uzantıları ve kollajen lifleri arasındaki sayısız temas ve kısa psödopodinin yayılması yoluyla, 1. Güne kıyasla kolajen matrisleriyle üstün etkileşimler nedeniyle, ağırlıklı olarak daha büyük ve daha düzensiz 3D kübik veya poligonal morfolojilerle



sonuçlanan daha da yayıldı. hücre zarlarından ECM'ye çıkıntılar gibi (Şekiller5 (c) ve 5 (d)).



**Şekil 2:** Cinsiyetsiz (30 PD), yüksek proliferatif / multipotent DPSC alt popülasyonunun SEM görüntüleri, (a) 1. Günde ( $\times 700$  büyütme), (b) 1. Günde ( $\times 2.500$  büyütme), (c) 12. Gün ( $\times 1.100$  büyütme) ve (d) 12. Gün ( $\times 3.500$  büyütme) [16].

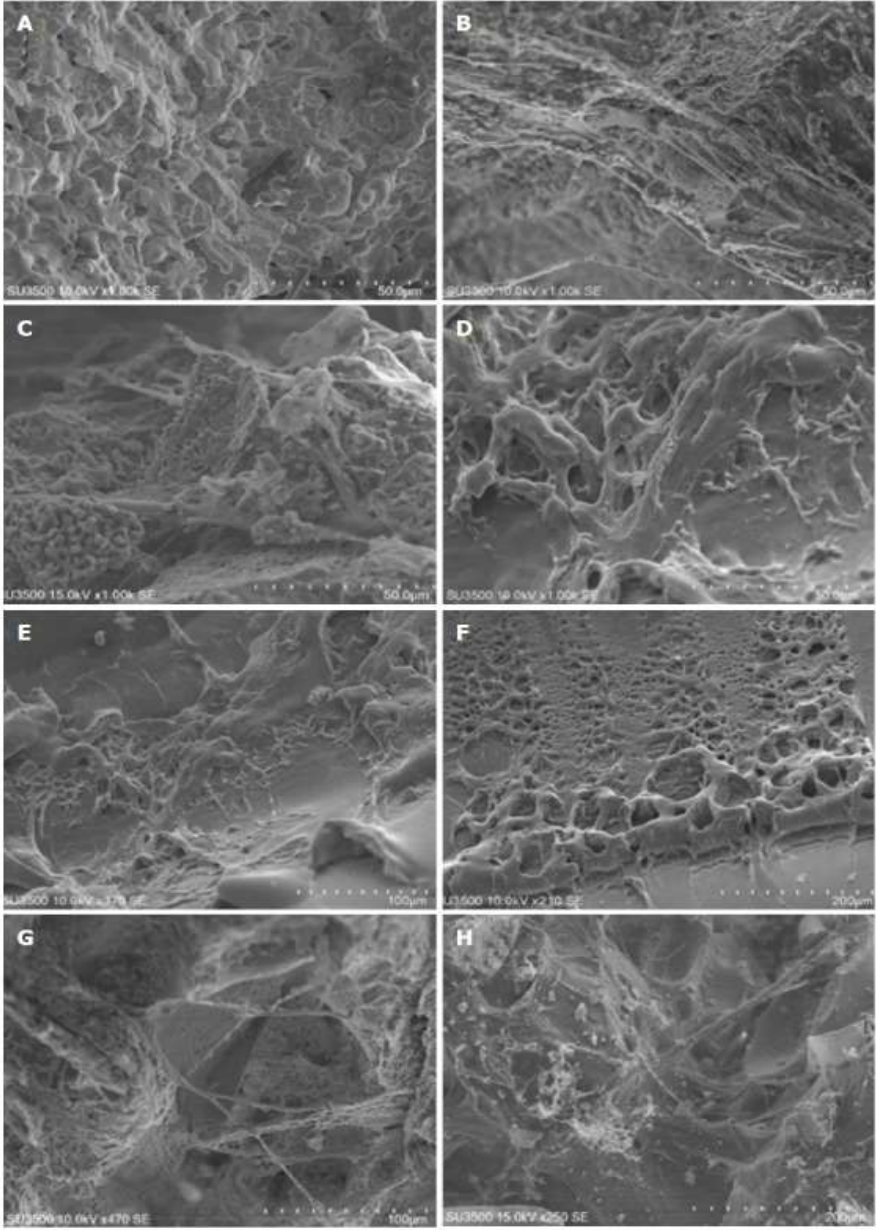
İyileşmeyen kraniyofasiyal defektler sıklıkla travma, enfeksiyon, tümör ve doğumsal deformiteler gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak ortaya çıkar [17]. Büyük kemik kusurlarının tedavisi rekonstrüktif cerrahlar için bir zorluk teşkil etmektedir. Kraniyofasiyal kemik defektlerinin tedavisi için geleneksel tedavi yaklaşımı, otojen kansellöz kemik greftinin, özellikle

ilia krestinden alınması ve nakledilmesidir. Bununla birlikte, cerrahi prosedürler invazivdir ve genellikle donör saha morbiditeleri ve sınırlı ulaşılabilirlik ile ilişkilidir. Diğer bir yaklaşım, immünojenisite veya hastalık bulaşma riski ile de sınırlı olan allojenik kemiğin kullanılmasıdır. Uygun üç boyutlu (3D) iskeleler ile kombinasyon halinde yetişkin kök hücrelerin (ASC'ler) hasat edilmesi kavramı rekonstrüktif cerrahide umut verici bir alternatif yaklaşım olarak önerilmiştir [18]. ASC'ler çeşitli dokulardan izole edilmiştir. Diş kliniğinde, ortodontik tedaviler dahil başka komplikasyonlardan kaçınmak için genellikle dişlerin çekilmesi gerekir. İnsan diş özü, çekilmiş dişlerden elde edilmiştir ve çok soylu progenitör / kök hücre popülasyonu, diş özü kök hücreleri (hDPSC'ler) içerdiği gösterilmiştir. HDPSC'lerin osteoblast soyuna göre farklılaşma yetenekleri ve erişilebilirlikleri ve ex-vivo genişleme kolaylığı onları iskelet kusurlarının onarımı için dikkate alınacak uygun hücre kaynağı haline getirmektedir [19,20]. HDPSC'lerden kemik oluşumu, iskeleler tarafından sağlanan 3 boyutlu bir yapıya ihtiyaç duyar. İdeal bir iskele, hücresel bağlanma, büyüme ve farklılaşma için uygun bir ortam sağlamalıdır. Doku mühendisliğinde çeşitli uygulamalar için çok çeşitli iskele biyomalzemeleri geliştirilmiştir [21]. İskeleler aşağıdaki gruplar olarak kategorize edilebilir: (1) Allograft; (2) Ksenograft; (3) Sentetik; ve (4) Kompozit biyomalzemeler. Kraniyofasiyal mühendislik için uygun bir iskele seçmek için, hücre-iskele etkileşimlerini in vitro olarak değerlendirmek gerekir . Mevcut çalışma, belirli gruplardan ticari olarak temin edilebilen dört iskelede hücre yapışması, bağlanması ve

farklılaşması dahil olmak üzere hDPSC'lerin davranışını araştırmayı amaçlamaktadır.

### **HDPSC morfolojisi ve yapışmasının değerlendirilmesi**

Yapı iskelelerinin 3 boyutlu yapısının hücre tohumlaması için uygunluğu, SEM görüntüleme kullanılarak hücre morfolojisi ve yapışması gözlemlenerek değerlendirildi. 7 gün sonra SEM mikro fotoğrafları, tüm biyomateryal yapı iskelelerinde hDPSC'lerin yapıştığını doğruladı (Şekil(Şekil1-D)1-D) SureOss (Allograft) hariç (Şekil (Şekil1A).1 A). PLLA iskelesinde (Sentetik) işaretlenmiş hücre toplanması gözlemlendi (Şekil(Şekil1D-F).1G-F). hDPSC'ler neredeyse tüm PLLA iskele yüzeyini kapladı. Aksine, Cerabone (Xenograft) ve OSTEON II Collagen (Kompozit) iskelelerinin yüzeyinde daha az hücre toplandı (Şekil(Şekil1B1Bve C). Cerabone (Xenograft) ve OSTEON II Kollajen (Kompozit) iskelelerindeki yapışkan hDPSC'ler, birkaç sitoplazmik uzantı ile fibroblastik morfoloji göstermiştir (Şekil(Şekil 1-F).1-F). Osteoblastik benzeri morfoloji, yuvarlak benzeri şekil, PLLA (Sentetik) iskeleye bağlı hücrelerde gözlemlendi (Şekil(Şekil1B,1B, C, G ve H).



**Şekil 3:** Dört farklı iskelede insan diş özü kök hücre ekinin ve morfolojisinin taranan elektron mikroskobu mikro fotoğrafları. A: SureOss (Allograft); B: Cerabone (Xenograft); C: OSTEON II Kollajen

(Kompozit); D: PLLA (Sentetik); E ve F: daha düşük büyütmede PLLA; G ve H: Daha düşük büyütmede Cerabone. Hücrelerin PLLA'nın (DF) neredeyse tüm iskele yüzeyini kapladığını unutmayın. Ayrıca, PLLA yüzeyindeki bağlı hücrelerin fibroblastik morfoloji (DF) gösterdiğini, buna karşın Cerabone ve OSTEON II Kolajen üzerindeki hücrelerin osteoblastik fenotip (B, C, G, H) gösterdiğine dikkat edin [22].

Klinik olarak derin çürük diş pulpasında iltihaplanmaya neden olabilir. İltihaplı pulpayı yatıştırmak için çeşitli materyallerin kullanılmasının yanı sıra, şu anda yeterli bir tedavi yoktur ve dentini / pulpayı örtmek için kullanılan altın standart olan kalsiyum hidroksit sınırlı etkiye sahiptir. Bazen pulpa enfekte kalır ve pulpitise neden olur ve nihayetinde pulpanın çıkarılması gerekir. Oral tedavinin ilk prensibi pulpayı korumaktır. Bu nedenle, derin çürüme koşullarında pulpa hücrelerinin immün tepkisini ve rejenerasyonunu incelemek gerekir. Terminal tamamlayıcı sistem proteinlerinden tamamlayıcı 5a (C5a), tamamlayıcı 3a (C3a) ve tamamlayıcı 4a (C4a) ile karşılaştırıldığında en güçlü etkiye sahiptir. C5a, C3a ve C4a'dan 20 ila 2.500 kat daha güçlüdür. Bu çalışmanın amacı, C5a arasındaki ilişkiyi aydınlatmaktır. kompleman aktivasyonu ve iltihaplanma süresi ile salgılanır. Diğer bir temel amaç, C5a ve reseptörü olan tamamlayıcı 5a reseptörünün (C5aR) ekspresyonunu tespit etmektir. Bu amaçla hücreler, lipoteikoik asit (LTA) veya lipopolisakkarit (LPS) ile uyarıya göre aşağıdaki şekilde 4 gruba ayrıldı: i) 1µ / ml LTA grubu; ii) 1 µ / ml LPS grubudur; iii) 1 µ / ml LTA ve 1 µg / ml LPS grubu; ve iv) bir kontrol görevi gören sadece

PBS grubu. Tüm 4 grup için 5 zaman noktası vardı: 1, 2, 3, 5 ve 7 gün. Ters transkripsiyon-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu, farklı zaman noktalarında C5a, C5aR ve interlökin (IL) -6'nın gen ekspresyon seviyelerini tespit etmek için kullanıldı. C5aR ifadesini saptamak için Western blot analizleri yapıldı. Diş pulpası hücrelerinin ultra yapısal özelliklerini değerlendirmek için transmisyon elektron mikroskobu da yapıldı. C5a ve C5aR mRNA'nın gen ekspresyon eğilimleri aynıydı. C5a ve C5aR mRNA, LTA veya LPS stimülasyonunun ikinci gününde yüksek oranda eksprese edildi. Bununla birlikte, LTA ve LPS ko-stimülasyon grubunda, C5a ve C5aR mRNA, hem birinci hem de ikinci günde yüksek düzeyde eksprese edildi ve ikinci günde daha yüksek seviyeler görüldü. IL-6 ekspresyonu, yalnızca LTA'da ve LTA + LPS ko-stimülasyon gruplarında ilerledikçe azaldı. Bununla birlikte, LPS grubunda ikinci günde ekspresyonunda bir tepe gözlemlendi. Genel olarak, bu çalışma gösteriyor ki 1µ LTA ve LPS stimüle insan diş özü hücre / ml konsantrasyonu C5a ifadesinin aktive edilmesi için.

Başka bir konuya değinecek olursak; Klinik olarak diş çürüğü kolaylıkla ihmal edilebilir ve semptomlar ortaya çıktığında genellikle pulpayı zaten etkilemiştir. Bunun için yaygın bir tedavi genellikle posayı çıkarmaktır. Pulpa nekrotik kalmasına rağmen bazen pulpa iltihabı hafiftir. Görünüşe göre, çürüme hamuru istila ettiğinde, hamurun kendi kendini onarma yeteneği, etkileriyle savaşacak kadar güçlü değildir. Bir dizi çalışma [23], pulpanın bir tür somatik kök hücre olan oldukça aktif ve farklılaşmış dental pulpa mezenkimal kök hücreleri içerdiğini ve dental pulpa kök hücrelerinin proliferatif ve

onarım rejenerasyon yeteneklerinin kemik iliği kök hücrelerinden daha güçlü olduğunu doğrulamışlardır. Bununla birlikte, diş pulpası hücrelerinin neden yabancı patojenlere karşı koyamadıkları ve pulpa iltihaplandığında nihayetinde nekroza açıklık getirilmesi gerekmektedir. Araştırmacılar, çürüklerin pulpayı daha fazla istila etmesini önlemek için etkili yöntemler araştırıyorlar. Klinik olarak, posayı etkilediği düşünülen posa canlılığını korumak için bazı dolaylı kapak malzemeleri kullanılmaktadır. Çalışmalar dentinin tamir işlem aşğıdaki azaltma (indüklenebilir göstermiştir [24]. Bununla birlikte, onarım ve yenilenme süreci aslında bir bağıışıklık sürecidir. İlk olarak, dişlerin yumuşak ve sert dokularından nispeten düşük seviyelerde enflamatuar moleküller salınır. Bu arada, Anga materyaline N-asetil sistein (NAC) gibi antioksidanların eklenmesi, p38 mitojenle aktive edilmiş kinaz sinyallesini (MAPK) yukarı doğru düzenleyerek nükleer faktör (NF) -κB proinflamatuar yolun aktivitesini sınırlayabilir. yol ve böylece ilgili sitokinleri serbest bırakır [25]. Bu süreç, pulpanın enflamatuar yanıtını en aza indirmede önemli bir rol oynar. Bu nedenle, diş sert doku onarımını teşvik etmek için daha uygun bir ortam sağlar. İyi bilindiği gibi, iltihaplanma ve doku hasarının ardından, tamamlayıcı sistem, işgalcileri ortadan kaldırmak ve konakçı hücreleri değiştirmek için gereken sinyalleri derhal sağlar. Kompleman sisteminin aktivasyonu esas olarak enfeksiyon yoluyla gerçekleşir; ancak travma yoluyla da başlatılabilir. Kompleman aktivasyonunu takiben, C3 konvertaz, C5 konvertaz, kompleman 3a (C3a), tamamlayıcı 3b (C3b), tamamlayıcı 4b (C4b), tamamlayıcı 5a (C5a) ve tamamlayıcı 5b gibi önemli biyolojik etkilere sahip bir dizi tamamlayıcı protein fragmanı (

C5b) oluşturulur. C3a, C4a ve C5a bazofiller / mast hücre degranülasyonu ve histamin, serotonin ve vasküler aktif medyatörlerin (daha yüksek bir serbest kalmasına neden olabilir. Daha sonra bunlar dolaylı olarak vasküler geçirgenliği değiştirir ve böylece enflamatuar tepkiye neden olur. C5a, tamamlayıcı bileşen C5'in proteaz C5-konvertaz tarafından C5a ve C5b fragmanlarına bölünmesinden salınan bir protein fragmanıdır. C5b, patojenin yüzeyinde birikir ve C5a daha sonra sıvı faza salınır. Bir anafilaksi olarak C5a, C3a ve C4a'ya kıyasla en güçlü etkiye sahiptir. C5a, C3a ve C4a'dan 20 ila 2.500 kat daha güçlüdür [26]. Bu nedenle, bu çalışmada araştırma için C5a'yı seçtik. Kompleman aktivasyonu, vücudu yabancı patojenlere karşı korur. Ancak bazen yukarıda anlatıldığı gibi aşırı aktif bir bağışıklık sistemi yoluyla vücuda zarar verebilir. Ek olarak, kompleman aktivasyonunu takiben lokal ve uzak organ yetmezliği gelişme riski, dolaşımdaki anafilotoksinlerin ve terminal kompleman kompleks seviyelerinin seviyelerine ve kompleman aktivasyonunun süresine bağlıdır. Yoğun doku hasarı ve büyük kompleman aktivasyonu olan hastalar, kontrolsüz inflammatuar reaksiyonlara ve ardından çoklu organ disfonksiyon sendromuna (MODS) eğilimlidir. Öte yandan, tamamlayıcı tükenmesi, kompleman eksikliği ya da eksojen tamamlayıcı önleyicilerinin uygulanmasıyla travma deney hayvanları ile klinik denemeler, inflammatuar uyarılara önemli organların önemli derecede azalmıştır ve koruyucu bir etkiye sahiptir olduğunu göstermiştir [27]. Bu denemeler, inflamasyon-onarım sürekliliğinin karşı tarafından travmanın neden olduğu inflammatuar yanıtta tamamlayıcının önemli rolünü doğrulamaktadır. Bu nedenle, kontrolsüz bir inflammatuar yanıt,



patolojik hasara yol açabilir. Çalışmalar, C5a'nın, iltihaplı hücrelerin esas olarak C5a reseptörü (C5aR) yoluyla iltihaplanma tepkisine dahil olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, C5a ve C5aR arasındaki etkileşimi bloke etmenin, inflamatuvar yanıtını inhibe etmesi beklenir. Yüksek C5a konsantrasyonları, ilgili immün hücreler için kemotaktik ajanlar olarak işlev görür ve immün hücrelerin nötrofiller, eozinofiller ve monositler gibi C5a'nın konsantrasyon gradyanı yönünde hareket etmesine neden olabilir. Yüksek C5a konsantrasyonları ayrıca nötrofillerin ve monositlerin oksidatif metabolizmasını uyarabilir, cGMP seviyesini artırabilir, lizozomların ve hücre zarlarının füzyonunu teşvik edebilir ve lizozomal enzimleri serbest bırakabilir. Ek olarak, C5a ayrıca özellikle interlökin (IL) -1, IL-6, IL-8 ve tümör nekroz faktörü (TNF) - $\alpha$ 'nın monositler tarafından salgılanmasını indüklemek için bağışıklık tepkisini güçlendirme etkisine sahiptir ve T hücresi çoğalmasını ve antikörlerin B hücresi üretimini teşvik eder. C5a, karşılık gelen reseptörü C5aR'ye bağlanarak aktive edilebilir ve sisplatin ile ilişkili glomerülonefrit (16), romatoid artrit [28], akut akciğer hasarı gibi bir dizi inflamatuvar hastalığın patolojik gelişim süreçlerinde rol oynar [29], piyemi ve ateroskleroz ve tümör oluşumu gibi kardiyovasküler hastalıklar. Karaciğer üzerine yapılan araştırmalar, C5a'nın karaciğer dokusu rejenerasyonunda yer aldığını ve oldukça rejeneratif olduğunu göstermiştir. C5 eksikliği olan farelerin karaciğerleri toksinlerden zarar gördüğünde, CCL4 / kemokinler ile tedavi edildiğinde karaciğerleri yenilenemez. Bununla birlikte, tedavi edilen hayvanlara C5 veya C5a enjekte edildikten sonra karaciğer rejenerasyonu gözlemlenebilir. C5a'nın bu etkisi kalp dokusu yenilenmesinde de bulunabilir [30]. C5a

sadece implante edilmiş progenitör hücreler tarafından indüklenmekle kalmaz, aynı zamanda progenitör hücrelerin farklılaşmasını da destekler. İnsanlardaki kırıkların ardından, osteojenik farklılaşma sırasında mezenkimal progenitörlerde C5aR ekspresyonunda önemli bir artış olduğu bulunmuştur [31]. Bu aynı zamanda C5a'nın mezenkimal progenitör hücrelerin göçünü indüklediğini ve C5a'nın kırık kemik rejenerasyonunda rol oynadığını gösterir. Son yıllarda, C5a'nın diş pulpası iltihaplı hastalıkları ile ilişkili olduğu bulunmuştur [32]. Çürük, travma ve dolgu malzemesinin uyarılması diş pulpasında iltihaplanmaya neden olabilir. Şiddetli diş çürüğü sıklıkla pulpa nekrozuna yol açarken, hafif / orta dereceli çürük çürükler altında, in vivo olarak sağlıklı pulpayı koruyan ve onu bakteri istilasından ayıran bir dentin köprüsü gözlemlenebilir [33]. Çürüklerin ilerlemesi sırasında, odontoblastlar bakteriler ve toksinleriyle yüzleşen ilk hücrelerdir. Çürümenin uyarılmasının ardından dentin demineralize edilir ve dentin matriksinde salınan sinyal molekülleri diş pulpası hücrelerine dağıtılır, böylece odontoblastların salgılama aktivitesi uyarılır, odontoblastların aktivitesi yukarı regüle edilir ve reaktif dentin sentezlenir, böylece bakteri ve toksinlerinin posayı istila etmesini önler. Pulpaya yakın veya içine uzanan derin çürüklerle pulpadaki fibroblastlar uyarılır ve sentetik kapasitesini artırır. Bu, tamamlayıcı proteinlerin sentezini ve dentin köprülerinin kurulması için gerekli progenitör hücrelerin görevlendirilmesi için tamamlayıcı sistemin aktivasyonunu içerir. Çözünür fragmanlar C3a, C4a, ve kompleman aktivasyonunu takiben üretilen C5a, bazofillerin / mastositlerin degranülasyonunun indüksiyonu yoluyla dolaylı olarak vasküler

geçirgenliği modifiye eder. Bu, daha sonra, vasküler geçirgenliği artıran büyük bir histamin ve serotonin serbestleşmesine yol açar. C3a, C4a ve C5a ayrıca, kasılma üzerine lökosit diyapedezini kolaylaştıran lif stresi oluşumunu indükleyerek endotelial hücre geçirgenliği üzerinde etki eder. Bu parçaların yaratılan gradyanı, lökosit göçünü enfekte / iltihaplı dokuya doğru yönlendirir. Buna paralel olarak, C5a pulpa progenitör hücrelerini aktive eder ve üretilen C5a gradyanı, dentin-pulpa rejenerasyon sürecini başlatmak için yaralı dokuya doğru göçünü yönlendirir ( Bu, daha sonra, vasküler geçirgenliği artıran büyük bir histamin ve serotonin serbestleşmesine yol açar. C3a, C4a ve C5a ayrıca, kasılma üzerine lökosit diyapedezini kolaylaştıran lif stresi oluşumunu indükleyerek endotelial hücre geçirgenliği üzerinde etki eder. Bu fragmanların yaratılan gradyanı, lökosit göçünü enfekte / iltihaplı dokuya doğru yönlendirir. Buna paralel olarak, C5a pulpa progenitör hücrelerini aktive eder ve üretilen C5a gradyanı, dentin-pulpa rejenerasyon sürecini başlatmak için yaralı dokuya doğru göçünü yönlendirir ( Bu, daha sonra, vasküler geçirgenliği artıran büyük bir histamin ve serotonin serbestleşmesine yol açar. C3a, C4a ve C5a ayrıca, kasılma üzerine lökosit diyapedezini kolaylaştıran lif stresi oluşumunu indükleyerek endotelial hücre geçirgenliği üzerinde etki eder. Bu fragmanların yaratılan gradyanı, lökosit göçünü enfekte / iltihaplı dokuya doğru yönlendirir. Paralel olarak, C5a pulpa progenitör hücrelerini aktive eder ve üretilen C5a gradyanı, dentin-pulpa rejenerasyon sürecini başlatmak için yaralı dokuya doğru göçünü yönlendirir ( Bu parçaların yaratılan gradyanı, lökosit göçünü enfekte / iltihaplı dokuya doğru yönlendirir. Paralel olarak, C5a pulpa progenitör

hücrelerini aktive eder ve üretilen C5a gradyanı, dentin-pulpa rejenerasyon sürecini başlatmak için yaralı dokuya doğru göçünü yönlendirir ( Bu fragmanların yaratılan gradyanı, lökosit göçünü enfekte / iltihaplı dokuya doğru yönlendirir. Paralel olarak, C5a pulpa progenitör hücrelerini aktive eder ve üretilen C5a gradyanı, dentin-pulpa rejenerasyon sürecini başlatmak için yaralı dokuya doğru göçünü yönlendirir [34]. Bu, herhangi bir lokal doku onarımının doğrudan dentin pulpa rejenerasyonuna yol açtığını açıkça göstermektedir. Kompleman aktivasyonu kaybının erken dentin pulpası rejenerasyonu ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir. Dental pulpa fibroblastları, tüm kompleman proteinlerini ve ikincil kompleman aktivasyonunu sentezleyen hücreler ile immün olmayan hücreler olarak kullanılabilir. C5a'nın dentin pulpası rejenerasyonunun erken safhasında yer aldığı gösterilmiştir; başka bir deyişle, diş pulpası progenitör hücrelerinin C5a ürün bölgesine seçici toplanma reaksiyonu, belirli bir gradyana yanıt verir. Diş onarımı ve rejenerasyonu, dentin tübüllerinde veya pulpa yaralarının çevresinde (reaktif / restoratif dentin olarak adlandırılır) mineralize dokuyu sentezleyebilen odontoblastlar gerektirir. Bu, posayı istilacı bakterilerden korur. Son 5 yılda, C5a ile ilgili çalışma sayısı artmıştır. I. About (Chmilewsky ve ark. ) Çalışma grubu Journal of Dental Research'te C5a'nın pulpa inflamasyonu ve kompleman aktivasyonundaki rolü üzerine birkaç makale yayınladı. Dental pulpa hücrelerindeki fibroblastların en büyük oranının, tüm kompleman proteinlerini sentezleyen ve ikincil kompleman aktivasyonu sağlayan hücrelerle immün olmayan hücrelerden oluştuğunu öne sürdüler. C5a tarafından indüklenen dental pulpa mezenşim kök hücrelerinin

toplanması, dentin pulpası rejenerasyonunda önemli bir adımdır. Ek olarak, I. Hakkında çalışma grubu, karyojenik bakterilerin ortadan kaldırılmasından sonra veya en azından raşitizmin daha fazla ilerlemesinin önlenmesinden sonra ortaya çıkan dentin-pulpa kompleksi rejenerasyonunun başlamasıyla ilgili bir hipotez sundu [33]. Bu nedenle, kompleman aktivasyonu, pulpada iltihaplanma ve rejenerasyonun aynı anda meydana gelmesine neden olur. Bakterilerin diş çürüğünün başlangıcı ile yakından ilişkili olduğu iyi bilinmektedir. Bakteriler, Gram negatif ve Gram pozitif türlere ayrılır. Pulpa iltihabının çoğu diş çürüklerinin gelişmesinden kaynaklanır. Gram pozitif bakteriler, kalın, yoğun bir peptidoglikan ve teikoik asitten oluşur. Teikoik asit, Gram-pozitif bakterilerin spesifik bir bileşenidir. Uzun zincirli bir formda peptidoglikan içine serpiştirilmiştir. Bir uç hücre duvarına duvar fosfatı (WTA) olarak bağlanır ve membran veya lipoteikoik asit (LTA) plazma membranına bağlanır. Gram negatif bakteriler, ince bir peptidoglikan tabakasını çevreleyen ve teikoik asit içermeyen bir lipopolisakarit (LPS) -lipoprotein-fosfolipid dış membrandan oluşur. Gram pozitif koklar organik maddeyi yok edebilir ve dişler uzun süreli etkiden sonra çürükler oluşturabilir. Asit üreten bakteriler, karbonhidratları asit üretmek için ayrıştırabilen Gram negatif bakterilerdir ve bu da diş minerallerinin demineralizasyonuna yol açar [35]. Çürük gelişimi ile birlikte plaktaki bakteri oranı sürekli olarak değişebilir. Hem LTA hem de LPS antijen görevi görür ve birçok inflamatuvar faktör salgılamak için bağışıklık hücrelerini aktive eder [36]. Dental pulpa hücrelerini uyarmak için LTA veya LPS kullanan bazı çalışmalar mevcuttur. LTA, LPS'den daha az sıklıkla

bildirilmesine rağmen, LTA ve LPS'nin antijen olarak aktivasyonu bağışıklık hücreleri için ayıdır. Bu nedenle, bağışıklık tepkisini tespit etmek için ikisini de kullanırız. Hücrelerin enflamatuvar yanıtı, transkripsiyon faktörleri nükleer faktör (NF) - $\kappa$ B ve ayrıca mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) familyasına ait olanlar, örneğin hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) dahil olmak üzere hücreler arası sinyal yollarının aktivasyonunu gerektirir JNK ve s38. IL-6 ve IL-8 gibi proinflamatuvar uyarı üzerine tipik olarak fibroblastlar tarafından üretilen sitokinler. Özellikle IL-6 ve IL-8, çürük maruziyetinde pulpa inflamasyonu ile ilişkilidir [37]. Bu nedenle IL-6 veya IL-8'in ekspresyonu, hücrelerin enflamasyonunu gösterebilir. Enflamasyon meydana geldiğinde ve pulpayı istila ettiğinde C5a'nın salgılanması üzerindeki etkilerin belirlenmesi ilgi çekici olacaktır. Bu nedenle, bu çalışmada, C5a ve reseptörü C5aR'nin ekspresyonunu tespit etmeyi amaçladık. Bu nedenle, C5a'nın diğer organların ve pulpitisin rejenerasyonundaki rolüne dayanarak, bu çalışmanın amacı iltihaplı pulpalarda C5a, C5aR ve IL-6'nın varlığını incelemek ve diş pulpası iltihabındaki rolünü aydınlatmaya çalışmaktı. Dental pulpa hücre farklılaşmasının adipositlere, kondroblastlara ve osteoblastlara indüksiyonu

Hücreler,% 5 CO ile 37 ° C bir inkübatörde üçüncü nesil kültürlenmiştir 2 . Hücrelerin her grupları, 1 x 10 yoğunluğunda plakalanmıştır 5 oyuk başına. Adipositlere ayırt etmek için diş hamur kök hücreleri (DPSCs) neden olmak için, kültür ortamı, 0.5 ile takviye edilmiştir  $\mu$  M 3-izobutil-1-metilksantin, 50  $\mu$  indometasin M ve 0.5  $\mu$  3 hafta M

deksametason. Adipojenik kültürler, oda sıcaklığında 30 dakika süreyle% 4 paraformaldehit içinde sabitlendi ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında taze Yağ Kırmızısı O çözeltisi (Sigma-Aldrich) ile boyandı. Kondroblast indüksiyon ortamı 1 oluşuyordu  $\mu$  M deksametason, 37.5  $\mu$ g / ml C vitamini-fosfat, 1 mM sodyum piruvat, 10 ng / ml dönüştürücü büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), 1 ng / ml  $\beta$ -fibroblast büyüme faktörü ( $\beta$ -FGF), 1X İnsülin-Transferrin-Selenyum premiks (Sigma-Aldrich; Merck KGaA), DPSC'lerin 3 hafta süreyle muhafaza edildiği. Kondrojenik kültürler, oda sıcaklığında 30 dakika süreyle% 4 paraformaldehit içinde sabitlendi ve toluidin mavisi (Toluidine Blue O Cartilage Stain solution, Solarbio Life Sciences) ile 37 ° C'lik bir inkübatörde 30 dakika boyandı. Osteoblast indüksiyon ortamı, DPSC'lerin 3 hafta boyunca kültürlendiği 10 nmol / l deksametazon, 5 mmol / l p-gliserofosfat ve 50 mg / ml C vitamini-fosfat içeriyordu. Osteoblast kültürleri, 37 ° C'de 30 dakika süreyle% 95 etanol içinde sabitlendi ve 37 ° C'lik bir inkübatörde 30 dakika boyunca Alizarin Red S (Sigma-Aldrich) ile boyandı. Hücreler bir ışık mikroskobu (ZEISS).

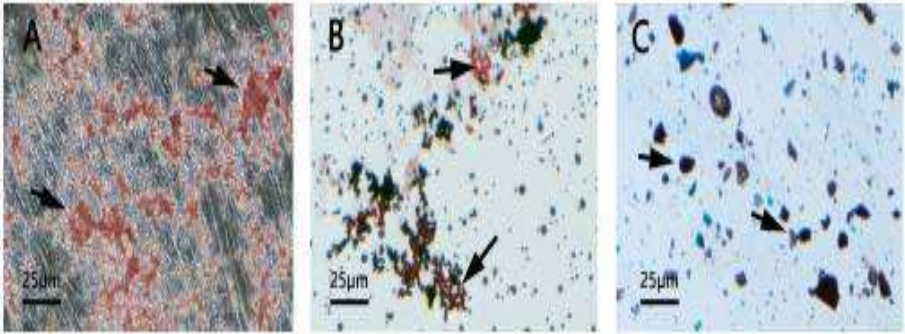
### **Transmisyon elektron mikroskobu elektron mikroskobu (TEM)**

DPSC'ler toplandı ve oda sıcaklığında ~ 2-3 saat% 2.5 glutaraldehit 0.1 M kakodilat tamponunda (pH 7.4) sabitlendi. Numuneler,% 1 osmiyum tetroksit içinde sonradan sabitlendi ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca 0.1 M fosfat tamponunda (pH 7.4) çözündürüldü. Numuneler etanol içinde dehidre edildi ve Epon 812 içine gömüldü. Ultra ince kesitler

sulu uranil asetat ve kurşun (II) hidroksit içinde kontrastlandı, bir Hitachi 7000 TEM kullanılarak gözlemlendi ve fotoğraflandı.

### **Diş pulpası hücrelerinin in vitro farklılaşma potansiyelinin karakterizasyonu**

Mineralize nodüllerin varlığı, DPSC'lerin başarılı osteojenik indüksiyonunu göstermiştir (Şekil 1A). Sunulduğu gibi Şekil 1B nötr lipid vakuollerinin oluşumu ayrıca DPSC'lerin adipojenik potansiyelini de gösterdi. Ayrıca, DPSC'lerin indüksiyonu takiben kondroblastlara farklılaştığı gözlemlendi (Şekil 1C).

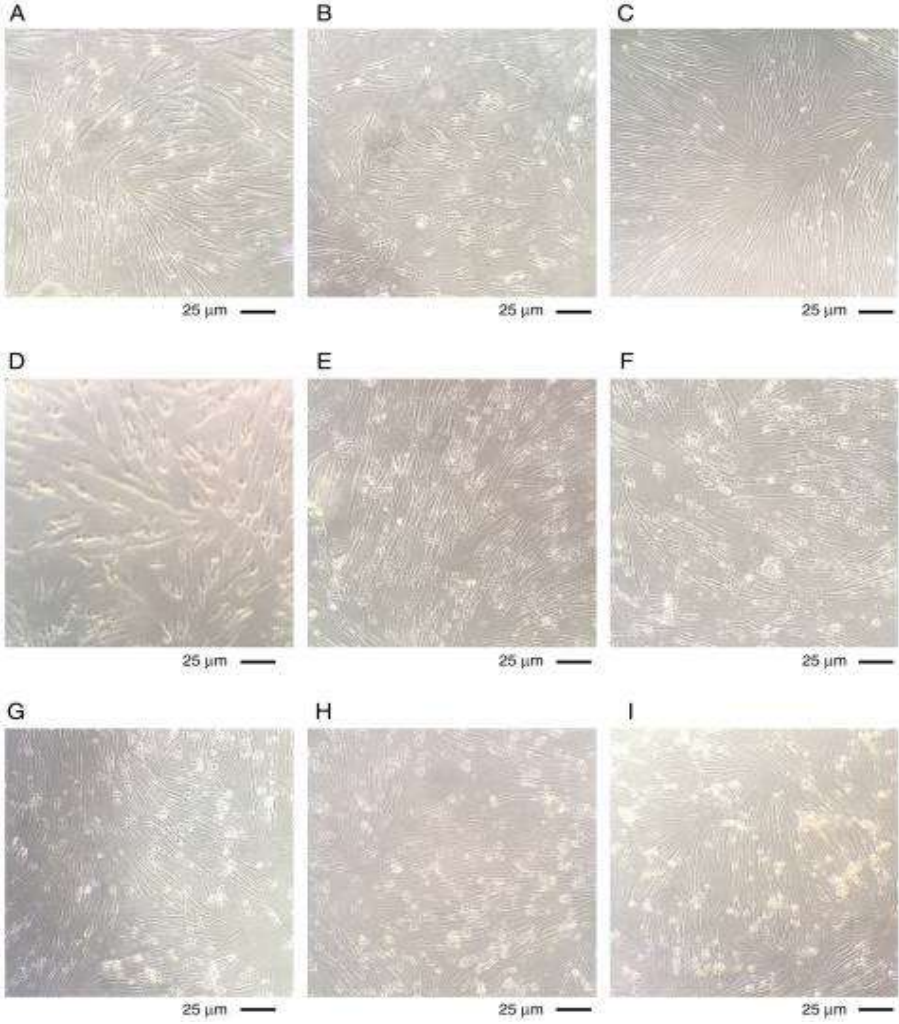


**Şekil 4:** Dental pulpa kök hücrelerinin çok sıralı farklılaşma kapasitesi (orijinal büyütme,  $\times 40$ ). (A) Osteojenik farklılaşma, Alizarin Red S boyamasıyla tespit edilen mineralize matrisin birikmesi ile gösterilmiştir. (B) Adipojenik farklılaşma, Yağ Kırmızısı O boyaması ile tespit edilen nötr lipid vakuollerinin birikimi ile gösterildi. (C) Kondroblastlar, toluidin mavisi boyama ile tespit edildi. Oklar, temsili boyanmış hücreleri gösterir [38].



## **LTA ve LPS ile farklı günlerde stimülasyonu takiben hücre durumu**

Kültürlenmiş hücreler bir mikroskop kullanılarak gözlemlendi. Uyarılmış tüm gruplardaki hücrelerin 1. günde sağlıklı bir durumda olduğu gözlemlendi (Şekil 3A, LPS tek başına Şekil 3B, LTA ve LPS ko-stimülasyonu Şekil 3C). Uyarılmış tüm gruplardaki hücreler hala iyi durumdaydı ve 2. günde az miktarda hücre küçülmesi görüldü (Şekil 3D, LPS tek başına Şekil 3E, LTA ve LPS ko-stimülasyonu Şekil 3F). 3. günde daha fazla hücre küçülmesi gözlemlendi (Şekil 3G, LPS tek başına Şekil 3H, LTA ve LPS ko-stimülasyonu Şekil 3I). 5. günde hücrelerin parçalara ayrıldığı ve durumlarının kötüleştiği gözlemlendi (Şekil 3J, LPS tek başına Şekil 3K, LTA ve LPS ko-stimülasyonu Şekil 3L). Hücre durumu beşinci gündeki kadar iyi değil, küçülme daha ciddidir ve yüzen ölü hücreler 7. günde görülebilir (tek başına LTAŞekil 3M, LPS tek başına Şekil 3N, LTA ve LPS ko-stimülasyonu Şekil 3 O).



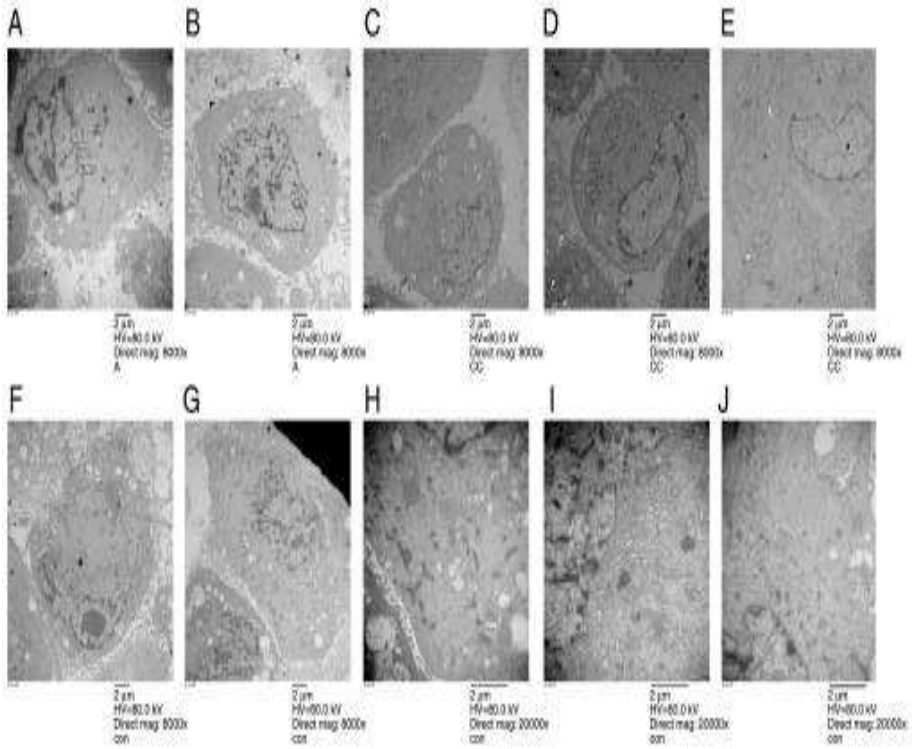
**Şekil 5:** LTA ve LPS ile farklı zaman noktalarında uyarılan dental pulpa hücrelerinin morfolojik görünümü. (A) LTA, (B) LPS ayrı ayrı ve (C) birlikte uyarım ile uyarılmanın ardından 1. günde hücre morfolojisi. Hücreler iyi durumda büyüdü. (D) LTA, (E) LPS ayrı ayrı ve (F) birlikte uyarım ile uyarımı takiben 2. günde hücre morfolojisi. Hücre küçülmesi gözlenmesine rağmen hücreler iyi durumda büyümüştür. (G) LTA, (H) LPS ayrı ayrı ve (I) ortak uyarım ile uyarımı takiben 3. günde

hücre morfolojisi. Daha fazla hücre küçülmesi gözlemlendi. (J) LTA, (K) LPS ayrı ayrı ve (L) birlikte uyarım ile uyarımı takiben 5. günde hücre morfolojisi. Hücrelerin büyüme durumu yavaş yavaş azaldı. (M) LTA, (N) LPS ayrı ayrı ve (O) birlikte uyarım ile uyarımı takiben 7. günde hücre morfolojisi. Hücreler şiddetli bir büzölmeye maruz kaldı. Yüzen ölü hücreler gözlemlenebilir. LTA, lipoteikoik asit; LPS, lipopolisakkarit [38].

### **Dental pulpa hücrelerinin ultrastrüktürel ve elektron mikroskopik özellikleri**

Uyarılmış dental pulpa hücrelerinin ultrastrüktürel özellikleri aşağıda gösterilmiştir. Şekil 8. Stimölasyonun ilk gününde lizozom sayısı arttı. Hücre zarındaki mikrovilli normaldi, bu da hücre durumunun iyi olduğunu ve mitokondri ve endoplazmik retikulumun etkilenmediğini gösterdi. Otofaji hücrelerin içinde gözlemlenebilir (Şekil 8A). 2 günlük stimölasyonun ardından hücreler iyi durumdaydı, ancak mikrovillus sayısı azaldı (Şekil 8B). Üçüncü gün, hücre durumu iyiydi, ancak daha fazla vakuol vardı. Mikrovillus sayısı azaldı, ancak hücrelerin aktivitesi hala iyiydi (Şekil 8C). Beşinci günde hücreler şişti ve hücreler yırtılarak ölmek üzereydi (Şekil 8D). Yedinci günde, ortadaki çekirdeklerle birlikte nekrotik hücreler gözlenebilirdi ve şişmiş hücre kenarları belirsizdi (Şekil 8E). Kontrol grubu küçük mitokondri gösterdi ve hücreler endoplazmik retikulum açısından zengindi, bu da hücrelerin proteini sentezleyecek kadar güçlü olduğunu gösterdi. Kontrol grubundaki ultrastrüktürel özellikler, birincil hücrelerin özelliklerine uygundur. Mitokondriler küçük ve gelişmemiş olmasına rağmen, sayıca

çoktu ve birçok glikojen sergiledi. Belki enerjileri glikojen yoluyla metabolize edilir. Düzensiz karyotip, sitoplazma ile temas alanını arttırmak için metabolik verimliliği artırabilir. 1. gündeki kontrol grupları şu şekilde gösterilir:Şekil 8F2. günde Şekil 8G3. gün Şekil 8H5. gün Şekil 8Ive 7. günde Şekil 8J.



**Şekil 6:** Dental pulpa hücrelerinin ince yapısı. (A) Stimülasyonun ilk gününde pulpa hücrelerinin ince yapısı. (B) 2 günlük stimülasyondan sonra diş pulpası hücrelerinin ince yapısı. (C) Stimülasyonun üçüncü gününde diş pulpası hücrelerinin ince yapısı. (D) Stimülasyonun beşinci gününde pulpa hücrelerinin ince yapısı. (E) Stimülasyonun yedinci gününde diş pulpası hücrelerinin ince yapısı. (F) 1. günde

kontrol grubundaki dental pulpa hücrelerinin ince yapısı (G) 2. günde kontrol grubundaki dental pulpa hücrelerinin ince yapısı (H) 3. günde kontrol grubundaki dental pulpa hücrelerinin ince yapısı (I) 5. günde kontrol grubundaki dental pulpa hücrelerinin ince yapısı (J) 7. günde kontrol grubundaki dental pulpa hücrelerinin ince yapısı LTA, lipoteikoik asit; LPS, lipopolisakkarit [38]. Bununla birlikte rejeneratif endodonti, henüz olgunlaşmamış dişler ve rejeneratif sonuçlardan ziyade onarıcı ile sınırlı olmasına rağmen, diş hekimliğinde bir paradigma değişimi olarak tanımlanmıştır. Düzenleyici sorunlar nedeniyle hücresiz tedaviler tercih edilmektedir. Bununla birlikte, konakçıdan türetilen kök hücrelerin istenen bölgeye alınması zor olmaya devam etmektedir. Proteinler, lipidler, RNA ve DNA içeren ve dolayısıyla ebeveyn hücrelerini yansıtan hücre dışı veziküller olan diş pulpasından türetilmiş ekzozomların bu amaçla kullanılıp kullanılmayacağını araştırdık. Ekzozomların kullanımı, daha yüksek bir güvenlik profili, daha kolay izolasyon, koruma ve kullanım nedeniyle nakledilen kök hücrelerin doğrudan kullanımına göre kayda değer avantajlar sağlayabilir. Burada kültürlenmiş bir üçüncü molar pulpa hücresinden ekzozomları topladık ve bunları transmisyon elektron mikroskobu ve Western blot ile değerlendirdik. İnsan mezenkimal kök hücreleri (MSC'ler), ekzozom alımını, hücre göçünü ve proliferasyonunu değerlendirmek için bu ekzozomlara maruz bırakıldı. Ek olarak, bir fibrin jel (yani, seyreltilmiş bir fibrin sızdırmazlık maddesi), ekzozomlar için bir iletim sistemi olarak değerlendirildi. Sonuçlarımız, ekzozomların MSC'leri çektiğini ve fibrin jelin etkilerini arttırdığını göstermektedir. Dahası, ekzozomlar

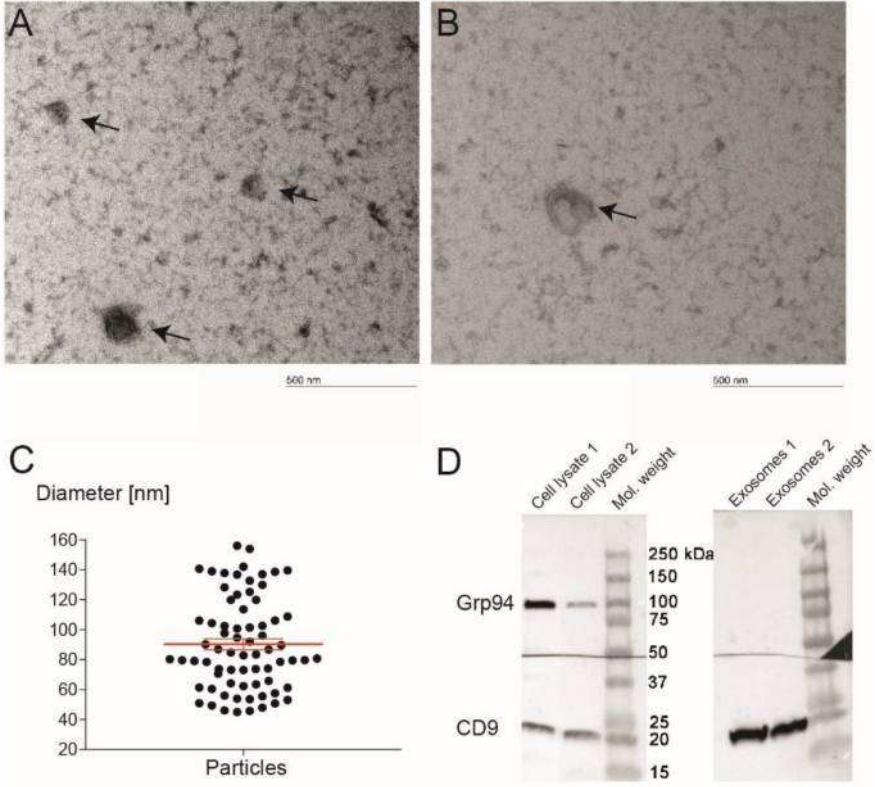
MSC'lerin çoğalmasını geliştirdi. Bu nedenle, bir fibrin jel ile kombinasyon halinde pulpadan türetilen eksozomların, iyileştirilmiş hücresiz rejeneratif endodontiye doğru klinik dönüşüm için güçlü bir kombinasyon olabileceğini ve bu nedenle diş sert dokularını doldurmanın yeni bir yolunu temsil edebileceğini öneriyoruz. eksozomlar için bir dağıtım sistemi olarak değerlendirildi. Sonuçlarımız, eksozomların MSC'leri çektiğini ve fibrin jelin etkilerini arttırdığını göstermektedir. Dahası, eksozomlar MSC'lerin çoğalmasını geliştirdi. Bu nedenle, bir fibrin jel ile kombinasyon halinde pulpadan türetilen eksozomların, iyileştirilmiş hücresiz rejeneratif endodontiye yönelik klinik dönüşüm için güçlü bir kombinasyon olabileceğini ve bu nedenle diş sert dokularını doldurmanın yeni bir yolunu temsil edebileceğini öneriyoruz. eksozomlar için bir dağıtım sistemi olarak değerlendirildi. Sonuçlarımız, eksozomların MSC'leri çektiğini ve fibrin jelin etkilerini arttırdığını göstermektedir. Dahası, eksozomlar MSC'lerin çoğalmasını geliştirdi. Bu nedenle, bir fibrin jel ile kombinasyon halinde pulpadan türetilen eksozomların, iyileştirilmiş hücresiz rejeneratif endodontiye doğru klinik dönüşüm için güçlü bir kombinasyon olabileceğini ve bu nedenle diş sert dokularını doldurmanın yeni bir yolunu temsil edebileceği önerilmektedir.

Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) için Negatif Boyamayı incelediğimizde;

## **Diş Pulpasından Elde Edilen Ekzozomların Karakterizasyonu**

Ekzozomların varlığı TEM ile doğrulandı (Şekil 1A, B), izole edilmiş parçacıkların çapının 45 ila 156 nm (Şekil 1C) ortalama boyutu 90 nm (% 95 güven aralığı 82 ila 97). Ekzozomlardan elde edilen proteinler ve pulpa hücre lizatu, Western blot için kullanıldı. İmmüno blotlar sunulan Şekil 1D, ekzozomlardan alınan numunelerin, normalde ekzozomların yüzeyinde bulunan protein olan CD9 için pozitif ve hücre lizatu için pozitif olan, bol miktarda yerleşik endoplazmik retikulum proteini olan Grp94 için negatif olduğunu göstermektedir.

Ekzozomların varlığını ve boyutunu doğrulamak için TEM analizi yapıldı. Bu deney için yeni izole edilmiş ekzozomlar kullanıldı. Bir bakır ızgaranın (G2300C, Plano GmbH, Wetzlar, Almanya) üstüne bir damla numune (10 uL) pipetlendi. PBS ile yıkandıktan sonra, numune% 1 gliseraldehit içinde 5 dakika inkübe edildi, tekrar yıkandı ve 5 dakika% 1 uranil asetat içinde inkübe edildi. Izgara daha sonra 10 dakika buz üzerinde metilselüloz lekesine aktarıldı. Metilselüloz kontrast boyası 100 uL% 3 uranil asetat ve 900 uL% 2 metilselülozdan hazırlandı. Daha sonra ızgarayı leke damlasından kaldırmak için bir delik kullanıldı. Fazla boyama çözeltisi, bir filtre kağıdı kullanılarak çıkarıldı ve buz üzerinde hava ile kurutuldu. Örnek, 80 kV hızlanan voltajda bir TEM CM100 mikroskobu (Thermo Fisher, Waltham, MA, ABD) kullanılarak gözlemlendi.

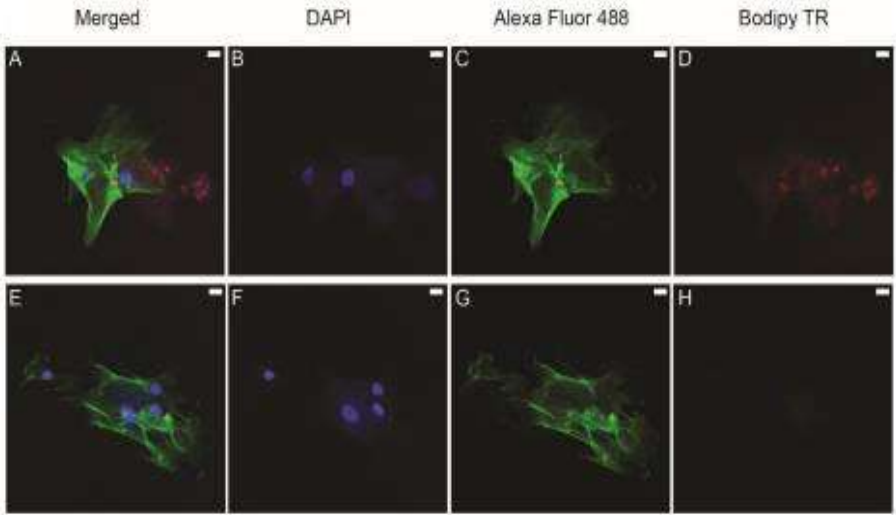


**Şekil 7:** Diş pulpasından elde edilen eksozomların karakterizasyonu. TEM, eksozomların ( A , B ) yapısını ve boyutunu incelemek için kullanıldı . Tipik lipit iki tabakalı yapıyı ( B ) gösteren ekstrakte edilmiş bir eksozom resmi . Ölçek çubuğu 500 nm'yi temsil eder. Mikroskop büyütme  $66.000 \times$  idi. İzole edilen parçacıkların çapının  $90 \pm 30$  nm ( C ) olduğu gözlemlendi . Western blot sonuçları, anahtar eksozomal membran proteini CD9'un eksozomlar için pozitif olduğunu, hücre proteini Grp94'ün ise eksozomlar ( D ) için negatif olduğunu gösterdi . Analiz, izole edilmiş veziküllerin gerçekten de eksozomlar olduğunu doğruladı [39].



## HBMMSC'ler Tarafından Etiketli Ekzozomların Alımı

BODIPY TR seramid boyası, ekzozomal membranın etkin bir şekilde etiketlenmesine izin verir ve DPC'lerin kültür ortamına eklenir. Etiketli ekzozomlar izole edildi ve HBMMSC'lere eklendi. İmmüno Floresan görüntüsü (şekil 2A), çekirdek (mavi renk) ve hücre iskeleti (yeşil renk) olarak etiketlenmiş HBMMSC'lerin yanındaki etiketli ekzozomları (kırmızı renk) gösterir. Etiketsiz ekzozomların eklendiği grup olan negatif kontrol, ekzozomları göstermedi (şekil 2E – H). Görüntüler 40 × büyütmede alınmıştır.



**Şekil 8:** Çekirdeği ( B , F ) boyamak için DAPI , sitoskeletal aktin ( C , G ) boyamak için Alexa Fluor 488 ve ekzozomları ( D , H ) boyamak için BODIPY TR'yi boyamak için ekzozom alımının eş odaklı immüno Floresan analizi . ( A , E ) birleştirilmiş görüntülerdir. Etiketli ekzozomlar, diş özü hücrelerinin (DPC'ler) kültür süpernatantlarından izole edildi. İnsan kemik iliğinden türetilmiş mezenkimal kök hücreler

(HBMMSC'ler), etiketli eksozomlarla kültürlendi. Kırmızı noktalar ( A , D ) eksozomları temsil eder. Kırmızı sinyal, etiketsiz eksozomların hücrelere eklendiği negatif kontrolde ifade edilmedi ( E - H). Ölçek çubuğu 20 um'yi temsil eder [39]. Diş özü, yaygın bir hastalık bölgesidir ve bu hastalık tipik olarak ağrı ile ilişkilidir. Aslında çeşitli uyarıların ya maruz kalan dentine uygulanması ya da pulpa dokusu genellikle ağrı hissi üretir [1]. İnsan diş özündeki sinir lifi yoğunluğu oldukça etkileyici ve birçok çalışma karakterize etti bu yapılar. Dişlerin alışılmadık sinirsel özellikleri vardır. yoğun polimodal nosiseptif duyu innervasyonu olarak koronal dentin, pulpa ve vaskülatür; seyrek otonom dentinalde innervasyon ve duyu sinir tutulumu sıvı dinamiği, pulpa kan akışını düzenleme, koruyucu diş dokularını ve diş yarasını korumaktadır [2]. Yapılan bazı çalışmalarda immünohistokimyasal ve elektron mikroskopu incelemesi yapılmakta olup, değerlendirmek için iltihaplı insan diş pulpası örnekleri sinir yapılarının morfolojik yönleri incelemiştir. Bir çalışmaya değinecek olursak; araştırmanın gerçekleştirilmesi için 20 örnek kullanıldı. Diş pulpa dokusu iki gruba ayrılır.

İlk çalışma grubu aşağıdaki örneklerle temsil edilmiştir:

linik semptomlar olmaksızın dişlerden toplanan pulpa dokusu pulpitis. Toplama, sekiz vakada prostetik nedenlerle yapılan pulpektomiler veya diş çekildikten sonra, iki ektopik yirmilik azı dişi için. İkinci çalışma grubu, doğrudan doğruya alandan toplanan 10 hamur dokusu örneği ile temsil edilmiştir. için yapılan pulpektomileri takip eden hamur odası terapötik nedenler, altı vakada, ekstraksiyondan sonra geri dönüşü

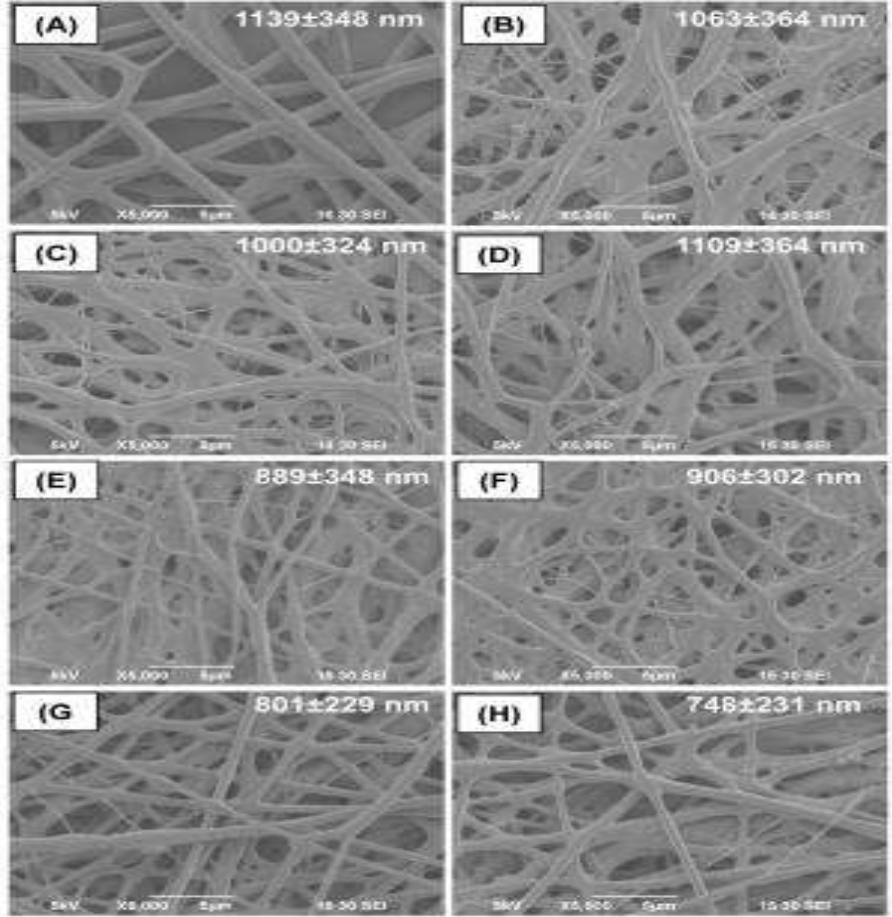
olmayan periodontal dişlerin lezyonlar (örneğin, diş hareketliliği derecesi 2–3), diğer dört durumlarda. Uygun toplama yapıldı iyi bilenmiş hamur haznesinden yeterli boyutlarda diş ekskavatörleri; kullanılmışlar pulpadaki pulpa dokusunu sistematik olarak kesmek odontoblastik tabaka ile birlikte gerçekleşti. Elektron mikroskobu çalışması için parçaları toplarken, elektron mikroskobu çalışmasının dayattığı iki koşulu dikkate alındı: çalışma için doku maksimum 2–2'de fiksasyona (0.15 M sodyum fosfat tamponunda% 2.5 glutaraldehit, pH 7.2) girmelidir. Kanla sulamanın kesilmesinden 3 dakika sonra; toplanan doku parçaları 1 mm<sup>3</sup> hacminin üzerinde olmamalıdır. Toplanan parça daha büyükse iki yeni tıraş bıçağı ile maksimum 1 mm<sup>3</sup> küpler halinde kesilmiş, dokuya baskı yapmayacak şekilde birleştirilerek paralel hareket ettirilmiştir. Bu şekilde toplanan numuneler westwnblot reçinesine dahil edildi ve transmisyonlu elektron mikroskobu üzerindeki çalışma göz önünde bulundurularak insan histolojik materyalinin hazırlanması için gerekli klasik aşamaları takip edildi. Muayene araçlarla yapıldı CCD kameralı JEOL JEM1010 elektron mikroskobunun kullanıldı. Elektron mikroskobu çalışmada, apikal foramenlerden nüfuz eden ve yaklaşık olarak kan damarlarının yörüngesini takip eden pulpaya duyarlı lifleri fark ettik. Miyelinli lifler, 2 ila 20 um arasında değişen bir çapa sahiptir. Bununla birlikte, miyelinli aksonlar, radikülerden periferik pulpaya doğru seyri sırasında geniş morfolojik değişikliklere uğradığı görülmektedir. Miyelinsiz lifler, hücre zarının oluklarında bulunur [40]. Bunlar, 2 µm çapında miyelinli olanlardan daha ince liflerdir. Miyelinsiz aksonların oranı, sıçanlarda kök apeks yakınında görülenden daha fazla koronal

lokasyonda daha fazla olduğu için, sıçan çalışmalarında da dişte ilerleyici bir miyelin kaybı görülmüştür [40]. Elektron mikroskobu çalışmada, iki çalışma grubu arasında, birkaç sinir lifi üzerinde filizlerin varlığı ve atipik biçimli bir Ranvier nodülü dışında önemli farklılıklar bulamadık. Bununla birlikte, bir dizi çalışma, sinir liflerinin Pulpa kan akışı ve iltihaplanma üzerindeki önemli etkiler, diş hasarı sonrası filizlenme ve sitokimyasal değişiklikler değişen pulpa sitokimyasına yanıt olarak ortaya çıkar [40]. Nosisseptif alarm sinyaline ek olarak, intradental duyusal aksonlar da düzenleyici bir rol oynayabilir.

Dental pulpa, dentini sentezleyen oldukça özelleşmiş hücreler olan odontoblastları barındırdığı için diş gelişiminde hayati bir rol oynar. Diş pulpasının travmatik yaralanmaları veya bakteriyel enfeksiyonu iltihaplanmaya ve kesintiye uğramazsa nekroza yol açar [41]. Çocuklarda pulpa nekrozu, odontoblastların ölümüne neden olarak kök gelişiminin bozulmasına neden olur. Geleneksel olarak, apikal gelişimin tamamlanmamış olduğu travmatik diş yaralanmaları, kanal içi kalsiyum hidroksit veya son zamanlarda mineral trioksit agregası yerleştirilerek apeksifikasyon terapisine tabi tutulmuştur [42]. Bununla birlikte, apeksifikasyon tedavisi sadece apikal kapanmayı desteklerken, kök gelişimine izin vermez [43]. Bu arada, nekrotik olgunlaşmamış dişlerin revaskülarizasyon tekniğiyle tedavisinin ardından klinik kanıtlar (örn. Dentin duvarlarının kalınlaşmasıyla birlikte kök ucu gelişimi) artmaktadır. Özünde, şu anda savunulan rejeneratif endodonti prosedüründe, metronidazol (MET) ve siprofloksasin (CIP) dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere bir antibiyotik kombinasyonunun

maksimum bakteri eradikasyonunu elde ettiği belirtilmiştir [44]. Farklılaşmamış hücreleri korumak için minimum kök kanal enstrümantasyonu ile mikrobiyal eliminasyon gerçekleştirilmelidir. Kök kanal dekontaminasyonunu takiben, doku mühendisliğine dayalı bir yaklaşım, periapikal bölgede kasıtlı kanamayı provoke etme süreci yoluyla gerçekleşir; burada fibrin bazlı bir matris oluşur ve bu, stemin bağlanmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklemek için bir iskele görevi görür. endojen olarak üretilen büyüme faktörlerinin katkısı sayesinde apikal papilladan hücreler. En önemlisi, literatüre göre, revaskülarizasyondan sonra pulpa benzeri doku oluşumunun gösterilmesi sadece yeni bir çalışmada gözlemlenmiştir. Bu arada, hem hayvan modellerinden hem de klinik vakalardan elde edilen verileri içeren çalışmaların büyük çoğunluğu, genellikle yeni oluşan istila edilmiş dokunun kemik benzeri sert doku içeren periapikal dokudan oluştuğunu ve kanal duvarlarının kalınlaşmasının oluşumuna bağlı olduğunu bildirmektedir. sement benzeri bir doku [44]. Teşvik edici kanıtlara rağmen, hücre popülasyonlarındaki hastadan hastaya içsel değişkenlik ve büyüme faktörlerinin miktarı ve çeşitliliği 3 , irriğanların ve antibiyotiklerin kullanımıyla bağlantılı aşırı kök hücre toksisitesiyle birleştiğinde, [45] antibiyotik kullanma fırsatını önerdi. - kök hücre canlılığını korurken kök kanal enfeksiyonunu ortadan kaldırmak için bir ilaç dağıtım sistemi olarak işlev görebilen lifli yapı iskeleleri [46]. Sentezlenmiş mikro / nano lifli yapı iskeletlerinin temsili SEM mikrografları, Şekil 1. Ortalama fiber çapı  $1139 \pm 348$  nm (PDS, kontrol) ile  $748 \pm 231$  nm (ağırlıkça% 25 CIP) arasında değişmiştir. Genel olarak, ağırlıkça% 5'in üzerindeki CIP konsantrasyonları,

PDS'den önemli ölçüde ( $p < .001$ ) daha küçük çaplara sahip liflerin oluşumuna yol açmaktadır [46].



**Şekil 9:** Yapı iskelelerinin temsili SEM mikrografları (5000 x): (A) saf PDS, (B) ağırlıkça% 1 CIP, (C) ağırlıkça% 2.5 CIP, (D) ağırlıkça% 5 CIP, (E) ağırlıkça% 10. % CIP, (F) ağırlıkça% 15 CIP, (G) ağırlıkça% 20 CIP ve (H) ağırlıkça% 25 CIP [46].

Kök kanal irrigasyonu, mikrobiyal enfeksiyonu kontrol altına almak için önemli bir yardımcıdır. Yapılan bir çalışmanın amacı,% 2.5 (ağırlık / hacim) sodyum hipoklorit (Na OCl ) ajitasyonunun *Enterococcus faecalis* biyofilminin uzaklaştırılması, öldürülmesi ve bozunması üzerindeki etkisini araştırmaktır . Her model, apikal boyutu 30 ve 0.06 koniklik 18 mm uzunluğunda simüle edilmiş kök kanal içeren toplam 45 kök kanal modeli ile 3D baskı kullanılarak üretildi. *E. faecalis* biyofilmleri, 10 gün boyunca modellerin apikal 3 mm üzerinde büyütüldü. Toplam 60 s 9 ml% 2,5 Na OCl'ine ve iğne ile irrigasyon yapıldı, irrigan ya kanalda durgun bırakıldı ya da manuel (Gutta-percha), sonik ve ultrasonik yöntemler kullanılarak 30 saniye süreyle ajite edildi. Sulamanın ardından, kalan biyofilmler, eş odaklı lazer taraması, taramalı elektron ve transmisyon elektron mikroskobu kullanılarak gözlemlendi. Veriler,  $p < .05$  anlamlılık düzeyinde Dunnett post hoc testleri ile tek yönlü ANOVA kullanılarak analiz edildi . Kök kanal irrigasyonunun sonucu, aktif irrigasyon grupları (manuel, sonik ve ultrasonik) ile elde edilen biyofilm miktarındaki azalmanın, pasif ve tedavi edilmeyen gruplara kıyasla önemli ölçüde daha fazla olduğunu göstermektedir (  $p < .05$  ). Toplu olarak, bulgular, pasif sulamanın model yüzeyinde manuel veya otomatik (sonik, ultrasonik) yöntemlerle karıştırılan sulamaya göre daha fazla biyofilm kalıntısı sergilediğini göstermektedir. Toplam biyofilm degradasyonu ve cansız hücreler ultrasonik grupla ilişkilendirildi.

### Taramalı elektron mikroskobu için numunelerin hazırlanması

Her gruptan üç model,% 2.5 NaOCl irrigantın SEM kullanılarak kalan yüzey biyofilmi üzerindeki etkisini değerlendirmek için incelendi. Sulamanın hemen ardından modeller, gece boyunca 4 ° C'de 0.1 mol / L sodyum kakodilat tamponu (pH 7.4) içinde% 3 glutaraldehit içinde sabitlendi. Daha sonra, dereceli bir alkol serisinde (% 50, 70, 90 ve 100) dehidre edilmiş, heksametildisilazan'da 5 dakika boyunca yerleştirilmiş ve havayla kurutulmuştur. Örnekler alüminyum pim saplamalara monte edildi ve incelemeye önce SEM (FEI XL30 FEG SEM, FEI, Eindhoven, Hollanda) kullanılarak 5 kV'de altın / paladyum ile püskürtmeyle kaplandı. Kanal yüzeyindeki rezidüel biyofilm x 2,000 ve x 8,000 büyütme kullanılarak kanal terminalinden 3, 2 ve 1 mm uzaklıkta görüntülendi.

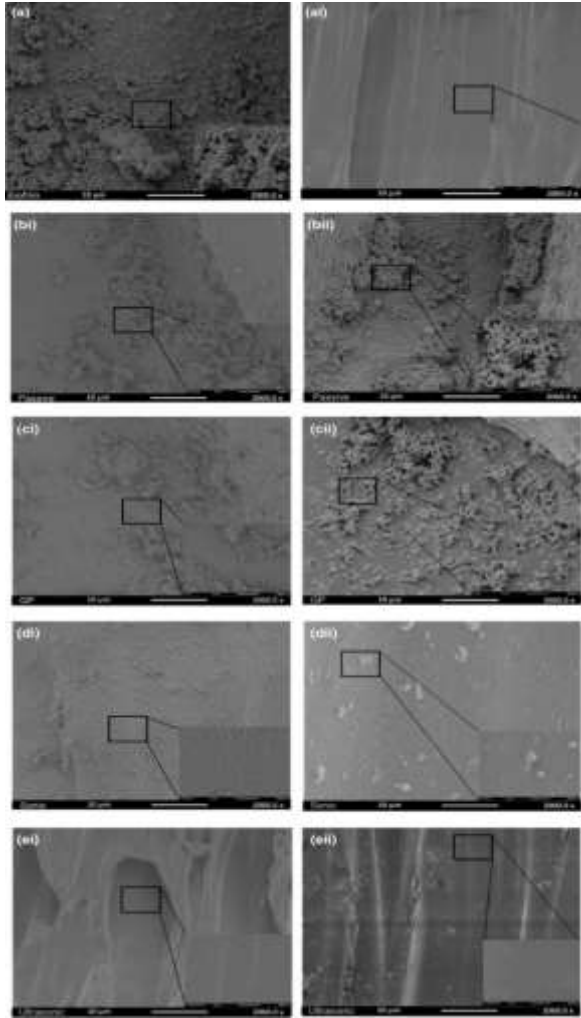
Ayrıca başka bir çalışmada Transmisyon elektron mikroskobu için numunelerin hazırlanmasına baktığımızda; her gruptan üç model,% 2.5 NaOCl'nin kalıntı biyofilm ve tek tek hücreler üzerindeki etkisini daha fazla değerlendirmek için TEM kullanılarak incelenmiştir. 0.1 mol / L kakodilat tamponu içinde% 3 glutaraldehit içinde sabitlemenin ardından, numuneler dereceli bir alkol serisinde (her biri 10 dakika için% 50,% 70 ve 3 x% 90) dehidre edildi. Daha sonra LR Beyaz reçine ve% 90 alkol (1: 1 oranında) 4 ° C'de 2 saat süreyle daldırılarak LR Beyaz reçine ile infiltre edildiler, ardından 30 dakika boyunca saf taze LR Beyaza bir değişiklik yapıldı, yeni bir değişiklik yapıldı. LR Beyaz bir gece 4 ° C'de. Ertesi sabah modeller, oda sıcaklığında 20 ml LR White ve 30 µl LR White hızlandırıcı içeren folyo kutulara gömüldü.



Folyo tenekede açıkta kalan reçine karışımının yüzeyi üzerine boyutlandırmak için kesilmiş bir parça para-film yerleştirilerek sertleştirme işleminden hava çıkarıldı. Kanalin yarı ince kesitleri (80–90) Diatome elmas bıçakla bir ultramikrotomda kesildi ve altın 200 gözlü ızgaralarda toplandı. Modeller daha sonra 5 dakika boyunca mutlak alkol içinde% 0.4 (w / v) uranil asetat ile ızgara üzerinde boyandı, modeller 80 kV'de çalışan bir TEM (Philips CM12, FEI, Eindhoven, Hollanda) üzerinde incelendi.

İşlem görmemiş modelde (kontrol grubu), biyofilmin CLSM görüntülerinin gözlemleri (Şekil 3a) ölü hücrelerden (kırmızı) daha fazla canlı hücre (yeşil) göstermiştir. Bu görüntülerin koyu arka planı, model materyallerin floresan olmayan özelliğini gösterir. Tedavi edilen gruplarda, CLSM görüntüleri tüm gruplarda kanal terminalinden 3 mm seviyesinde rezidüel biyofilm göstermedi (Şekil (Figure3ai).3ai). 2 mm seviyesinde, görüntüler tüm gruplarda canlı hücre göstermedi. Bununla birlikte, dağınık ölü biyofilm kalıntıları (kırmızı) pasif sulama grubunda daha boldu (Şekil(Figure3bi)3bi) manuel karıştırma grubundan (Şekil (Figure3ci).3ci). Biyofilmin tamamen çıkarılması, otomatik gruplarla (sonik, ultrasonik) ilişkilendirilmiştir (Şekil (Figure3di3di & ei, sırasıyla). 1 mm'de, görüntüler pasif sulama grubunda hem canlı hem de ölü hücreleri gösterdi (Şekil (Figure3bii)3bii) ve el kitabı (Şekil (Figure3cii)3cii) eski gruptaki ölü hücrelerden daha fazla canlı hücrelere sahip gruplar. Otomatik gruplarla ilgili olarak, hiçbir canlı hücrenin tespit edilmediği dikkat çekiciydi. Dahası, sonikteki ölü hücrelerin yetersiz kümeleri (Şekil

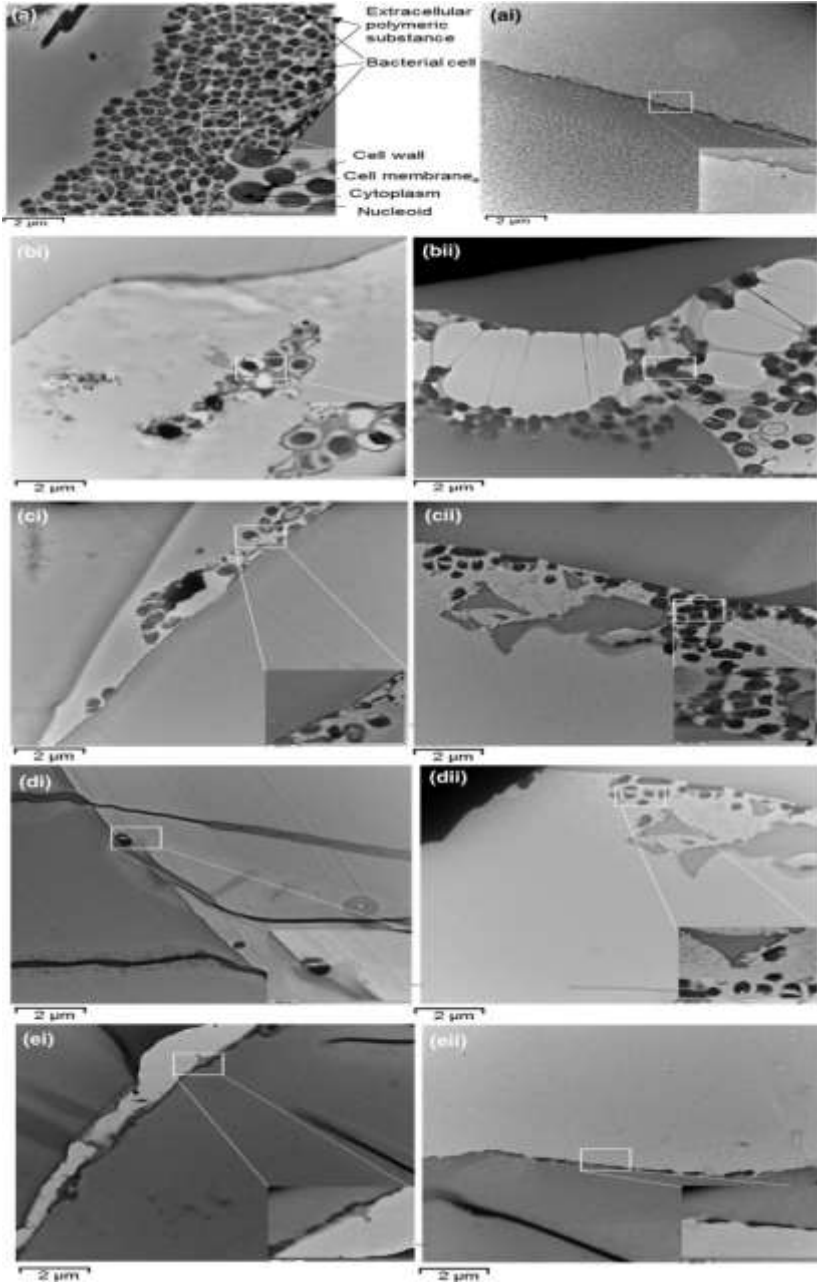
(Figure3dii)3dii) grubu ultrasonik gruba göre daha fazlaydı (Şekil 3ei). Sulama öncesi ve sonrası kök kanal modellerinin yüzeyindeki biyofilmin SEM ( $\times 2,000$ ,  $\times 8,000$  büyütme) görüntüleri Şekil'de sunulmuştur [47].



**Şekil 10:** SEM görüntüleri ( $\times 2,000$ ,  $\times 8,000$  büyütme), (a) *E. faecalis* biyofilminin 10 gün boyunca kök kanal modelinin yüzeyinde (kontrol)

büyümesini göstermektedir. (ai) şırınga irrigasyon protokolünden sonra kanal terminalinden 3 mm uzakta kalan biyofilm. (b) Pasif sulama grubu; (i) kanal terminalinden 2 mm uzakta kalan biyofilm; (ii) kanal terminalinden 1 mm uzaklıkta rezidüel biyofilm. (c) manuel karıştırma grubu; (i) kanal terminalinden 2 mm uzakta kalan biyofilm; (ii) kanal terminalinden 1 mm'de rezidüel biyofilm. (d) Sonik ajitasyon grubu; (i) kanal terminalinden 2 mm uzakta kalan biyofilm; (ii) kanal terminalinden 1 mm uzaklıkta rezidüel biyofilm. (e) Ultrasonik ajitasyon grubu; (i) kanal terminalinden 2 mm uzakta kalan biyofilm; (ii) kanal terminalinden 1 mm uzaklıkta rezidüel biyofilm [47].

Pasif sulama, manuel ve otomatik ajitasyon protokolleri kullanılarak sulamadan önce ve sonra kök kanal modellerinin yüzeyindeki biyofilmin TEM ( $\times 7.100$ ,  $\times 31.000$ ) görüntüleri sunulmuştur.



**Şekil 11:** TEM ( $\times 7.100, 31.000$ ) görüntüleri, (a) *E. faecalis* biyofilminin 10 gün boyunca kök kanal modelinin yüzeyinde (kontrol)

ürettiğini göstermektedir. (ai) şırınga irrigasyon protokolünden sonra kanal terminalinden 3 mm uzakta kalan biyofilm. (b) Pasif sulama grubu; (i) kanal terminalinden 2 mm uzakta kalan biyofilm; (ii) kanal terminalinden 1 mm uzaklıkta rezidüel biyofilm. (c) manuel karıştırma grubu; (i) kanal terminalinden 2 mm uzakta kalan biyofilm; (ii) kanal terminalinden 1 mm uzaklıkta rezidüel biyofilm. (d) Sonik ajitasyon grubu; (i) kanal terminalinden 2 mm uzakta kalan biyofilm; (ii) kanal terminalinden 1 mm uzaklıkta rezidüel biyofilm. (e) Ultrasonik ajitasyon grubu; (i) kanal terminalinden 2 mm uzakta kalan biyofilm; (ii) kanal terminalinden 1 mm uzaklıkta rezidüel biyofilm [47]. Kök kanal modelinde işlenmemiş biyofilmin TEM değerlendirmesi (Şekil 5a) EPS ile çevrili bakteri hücrelerinden oluştuğunu göstermiştir. Daha yüksek büyütmede, bakteri hücreleri belirgin bir kokoid görünüm, pürüzsüz ve sağlam bir dış hücre duvarı, sitoplazmayı çevreleyen bir hücre zarı ve hücre içinde elektron yoğun düzensiz şekilli alanlar sergilemiştir. % 2.5 NaOCl irrigasyonundan sonra TEM görüntülerinde kalıntı biyofilm görülmedi, tüm grupların 3 mm seviyesinde tespit edilmedi (Şekil (Figure5ai).5ai). Kalan biyofilmin 2 mm'deki TEM görüntüleri, pasif sulamada kapsamlı biyofilm bozulmasını, bakteriyel hücre deformasyonlarını / perforasyonlarını ve EPS'nin görünür şekilde çıkarıldığını gösterdi. 1 mm'de, biyofilm kalıntısındaki bakteri hücreleri, her iki pasif sulamada da hücre duvarlarını ve yapısal bütünlüklerini koruyor gibi görünüyordu. Karşılaştırıldığında, biyofilm kalıntısının hasarlı hücreleri sonikte bol miktarda bulunur. Tam biyofilm parçalanması ultrasonik ile ilişkilendirilirken gruplar. Genel olarak, NaOCl ile pasif irrigasyon, manuel veya otomatik (sonik,

ultrasonik) yöntemle karıştırılan NaOCl'den daha fazla biyofilm kalıntısı ile sonuçlanmıştır. Toplam biyofilm degradasyonu ve cansız hücreler otomatik gruplarla ilişkilendirildi.

Mineralizasyon, pirofosfat gibi küçük moleküller ve hücre dışı matrikste lokal olarak ve / veya sistemik olarak kalsiyum ve fosfat metabolizmasını düzenleyen proteinler (enzimler ve hormonlar dahil) dahil olmak üzere bir dizi belirleyici tarafından düzenlenir. Şu anda, bu moleküller arasındaki karmaşık bağlantılar tam olarak anlaşılmamıştır. Diş dentini için önemli olan (kemiğin aksine), dentin kalsiyum ve fosfat metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynamaması ve dentinin yeniden şekillenmemesidir. Bu nedenle, bu karmaşık moleküler etkileşimleri ve mineralizasyon mekanizmalarını deşifre etmede faydalı olabilecek kalıcı bir kronolojik hastalık kaydı gösteren bir dokudur. Hücre kültürü İnsan pulpası kök hücre kültürü, daha önce bildirildiği gibi [48] , insan pul pul dökülmüş süt dişlerinden (SHED'ler) oluşturulmuştur. Kısaca, povidon-iyot solüsyonu (Betadine, Meda Pharma, Fransa) ile dekontaminasyondan sonra, dişler uzunlamasına kesitlere ayrıldı ve açığa çıkan pulpa dokuları toplandı ve enzimatik olarak tip I kollajenaz (3 mg / ml; Worthington Biochem, Freehold, NJ, ABD) ile sindirildi. ve dispase (4 mg / ml; Boehringer Mannheim, Almanya). Tek hücreli süspansiyonlar, sindirilmiş dokuların 70 µm'lik hücre süzgecinden geçirilmesiyle elde edildi. Hücreler daha sonra 10 bir yoğunlukta tohumlanmıştır 4 / cm<sup>2</sup> ve kültürler Dulbecco Modified Eagle Medium 1 ile muhafazag / L D-Glukoz (DMEM; Invitrogen, Grand island, NY, ABD),% 10 fetal sığır serumu (FBS; Invitrogen),%

1 penisilin / streptomisin (PS; Invitrogen), 37 ° C'de% 5 CO ile desteklenmiştir 2 . Ortam, ilk hücre bağlanmasından sonraki gün ve ardından haftada 3 kez yenilenmiştir. Hücreler,% 70-80 konfluansta (% 0.25 tripsin EDTA çözeltisi Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) tripsinizasyon ile ayrıldı ve ya aynı yoğunlukta yeniden kaplandı veya -80 ° C'de donduruldu. Tüm deneyler için, 2 ve 4 numaralı pasajlar arasında SHED'ler kullanıldı. SHED fenotipleri (CD90 +, CD29 +, CD44 +, CD45-, CD73 +, CD105 +, CD146 + ve% 10 STRO-1 +) polikromatik akış sitometrisi analizi (LSRII , Becton Dickinson, NJ; Biolegend, CA, BDBiosciences, NJ ve eBioscience, CA'dan antikolar). Başka bir bir çalışmayı ele aldığımızda elde edilen numunelerin TEM, ışık mikroskobu ve Sem'deki takibi ve değerlendirmesine baktığımızda;

### **Taramalı Elektron Mikroskobu**

3 haftalık kültürden sonra, 3D kolajen / diş dilimi yapı iskeleleri, 4 ° C'de% 1 PBS tamponlu glutaraldehit içinde gece boyunca sabitlendi ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) için işlendi. Örnekler sıvı nitrojende kırıldı ve karbon veya altın püskürtmeli yüzeyler, bir Everhart-Tornley ve geri saçılmış elektron dedektörü (BSE) ve enerji dağıtıcı X ile donatılmış bir taramalı elektron mikroskobunda (Cambridge S260 SEM, İngiltere) gözlemlendi. Esprit2 yazılımı ile X-ışını mikroanalizi (Bruker Axs, WI, ABD) için ışını spektrometresi (EDX).

## **Işık Mikroskobu ve Geçirimli Elektron Mikroskobu**

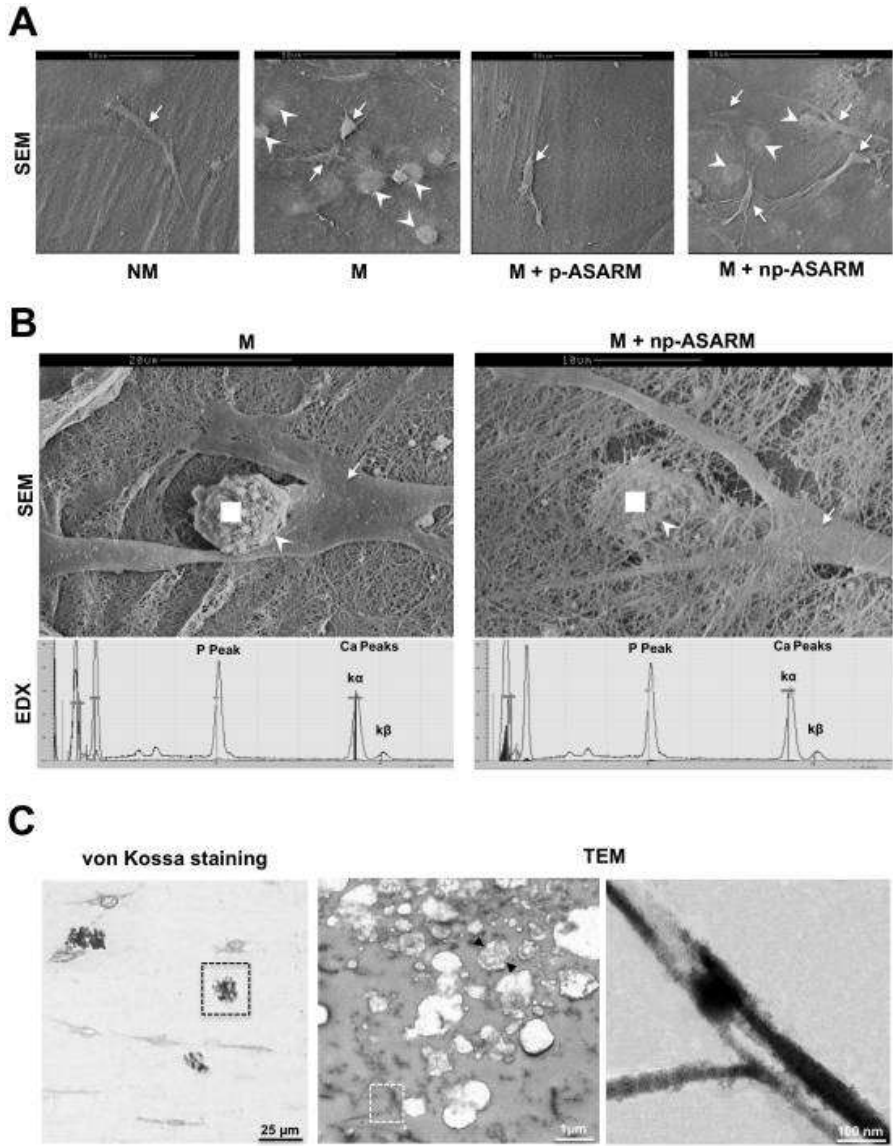
Hücreleri ve 3D kolajen / diş dilimi iskeletlerinin mineralizasyonunu analiz etmek için ışık mikroskobu ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanıldı. Yapı iskeletleri,% 4 paraformaldehit içinde 4 ° C'de gece boyunca sabitlendi ve metil metakrilat (Merck, Darmstadt, Almanya) içine gömüldü. Bir Reichert Ultracut S mikrotomu kullanılarak ışık mikroskobu için bir  $\mu\text{m}$  kalınlığında inceleme bölümleri kesildi ve bölümler, iskele içindeki mineralizasyon bölgelerini ortaya çıkarmak için von Kossa reaktifi (% 5 gümüş nitrat çözeltisi, Sigma) ile boyandı ve ardından toluidin mavisi ile zıt boyandı. . İnce kesitler (90 nm) kesildi ve bir elektron mikroskobu ızgarasına yerleştirildi, ardından oda sıcaklığında uranil asetat ve kurşun sitrat ile geleneksel boyama yapıldı ve bazı bölümler daha sonra von Kossa reaktifi (% 5 gümüş nitrat çözeltisi, Sigma) ile boyandı. p-ASARM Peptidi, SHED'lerin 3B Kültüründe ECM Mineralizasyonunu Engelliyor

P-ASARM'nin ECM mineralizasyonu üzerindeki rolünü incelemek için, SHED'ler 21 gün boyunca 3B modelde mineralleştirme (M) veya mineralize olmayan (NM) koşullar altında veya 20  $\mu\text{M}$  p-ASARM (M + p -ASARM) veya np-ASARM (M + np-ASARM). P-ASARM varlığında hiçbir mineralizasyon gözlenmezken, np-ASARM varlığında veya yokluğunda kolayca ayırt edilebilen mineralize nodüller gözlemlendi (İncir. 1C). Alev atomik adsorpsiyon spektrometresi ile gerçekleştirilen hücre kültürlerinden kalsiyum ölçümü, mineralize olmayan durumdaki kalsiyum içeriğine benzer



şekilde M + p-ASARM işlem koşulunda çok düşük kalsiyum seviyeleri göstererek mineralize nodül sayılarını doğruladı (Şekil 1D).

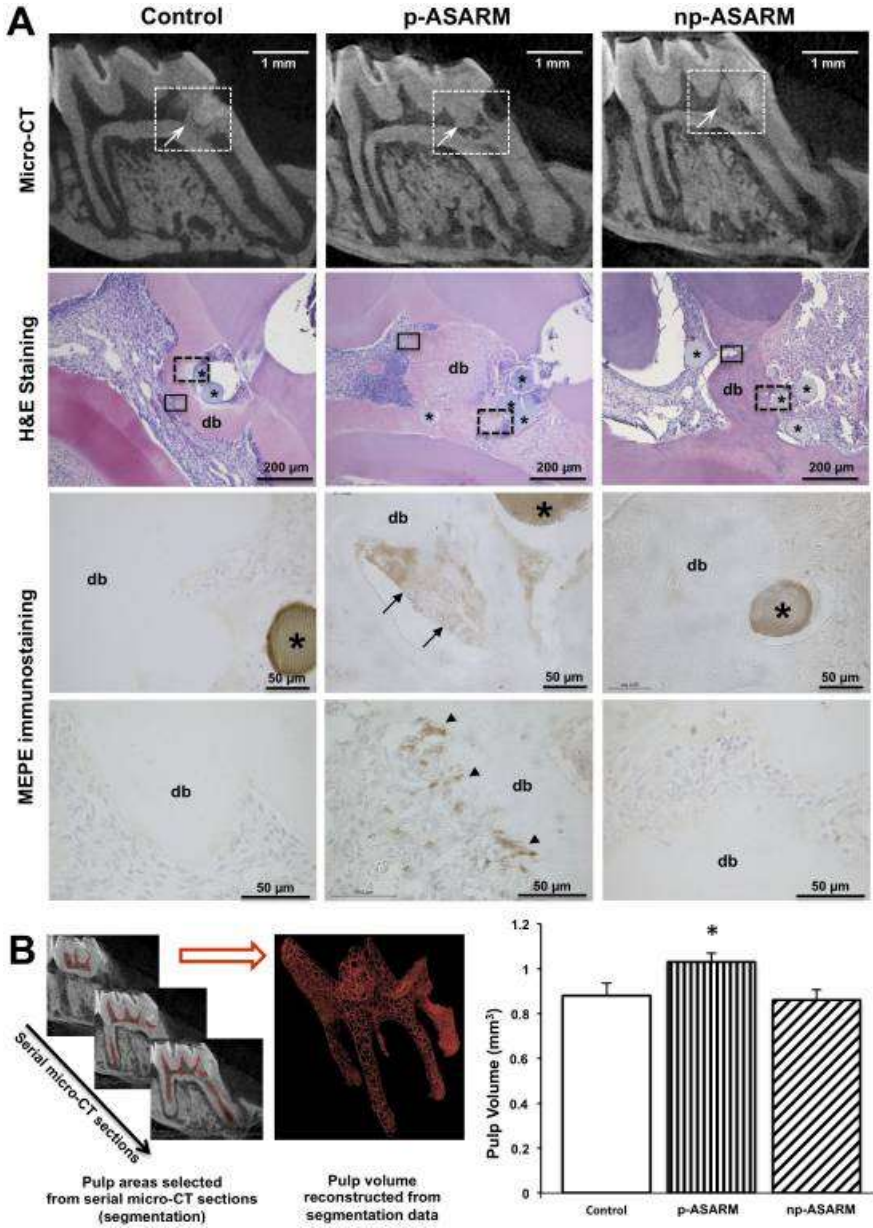
Kırık kollajen / diş dilimi iskeletlerinin taranmış elektron mikroskobu (SEM) ile örneklerin analizi, komşu hücrelerle yakın ilişki içinde kollajen ECM içinde mineralize nodüller gösterdi (İncir. 2A, B). Tüm koşullarda, diş dilimi ile temas halinde iyi ayırt edilebilen hücre süreçleri gözlemlendi ( Şekil S2 ). EDX spektroskopisi ile elde edilen mineralize nodüllerin kalsiyum-fosfat oranları, mineralizasyona izin veren iki koşul için (M ve M + np-ASARM,Şekil 2B), bir hidroksiapatit benzeri mineral fazının oluşumu ile tutarlıdır. Aksine, NM koşulları altında veya M + p-ASARM koşuluyla tedavi edilen hücre kültürleri, mineralizasyon kanıtı göstermedi (Şekil 2A). Mineralin oluştuğu koşullar altında, ışık mikroskobu ve mineralize iskele matriks bölgelerinin TEM ile analizi, kollajen fibrilleri arasında küçük bir nodüller tipte mineralizasyon gösterdi;Şekil 2C); p-ASARM ile işleme tabi tutulan kültürlerde böyle bir mineralizasyon gözlenmedi (veriler gösterilmemiştir).



**Şekil 12:** 3D SHED hücre kültürlerinde hücrelerin, matrisin ve mineralin ışık ve elektron mikroskobu.

21 gün boyunca 20 uM fosforile (p-ASARM) veya fosforile olmayan (np-ASARM) ASARM peptidin yokluğunda veya varlığında

mineralleştirici olmayan (NM) veya mineralleştirici (M) koşullarda tutulan SHED hücre kültürleri ışık mikroskobu ile görselleştirildi ve tarama (SEM) ve transmisyon (TEM) elektron mikroskobu. A, B: SEM, kollajen iskelesine iyi entegre edilmiş SHED'leri (oklar) ortaya koymaktadır. Kültürlerin mineralizasyonu, yalnızca M ve M + np-ASARM koşullarında kollajen iskelesi (ok başları) içinde nodüller olarak görünür. Nodüllerin (beyaz karede gerçekleştirilen) bileşimsel mikro analizi için enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX), elde edilen Ca / P oranı 1,67 +/- 0,05 olan kalsiyum (Ca) ve fosfor (P) için büyük spektral pikler gösterir. nodüllerin görüldüğü her iki mineralleşme koşulunda.C: Mineralize kültürlerin (M ve M + np-ASARM) ışık mikroskobu (sol panel) ve TEM (orta ve sağ panel). Mineralize nodüller (kara kutu, sol panel) genellikle SHED hücrelerine çok yakındır ve çok sayıda, daha küçük mineralizasyon nodüllerinden (ok başları) ve ara sıra mineralize kollajen fibrillerden (beyaz kutu merkez paneli ve sağ panel) oluşan kümelerden oluşur [49].

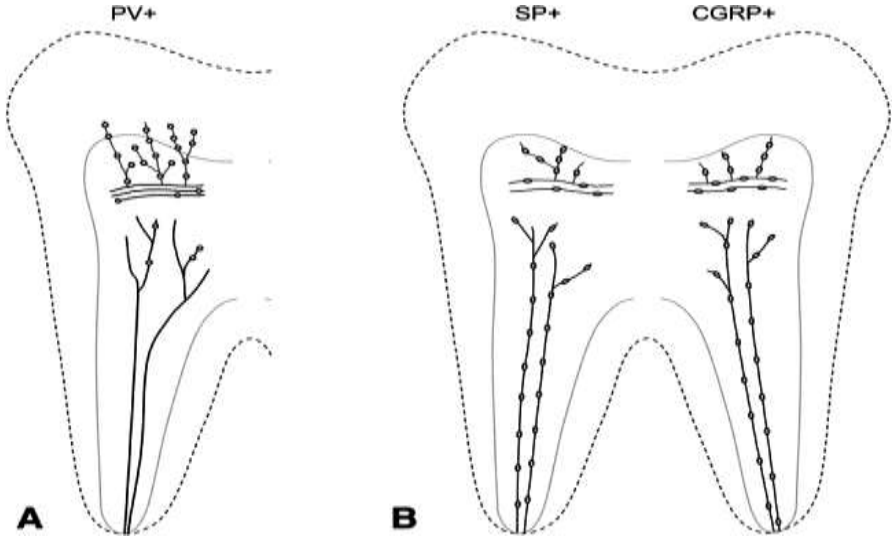


Şekil 13: MEPE-ASARM peptidlerinin bir sıçan dentin / pulpa yara modelinde onarıcı dentin mineralizasyonu ve MEPE ifadesi üzerindeki etkisi.

Bu in vivo veriler, p-ASARM veya np-ASARM veya tamponda (kontrol) ıslatılmış agaroz boncukların birinci üst molar pulpasına yerleştirilmesinden 1 ay sonra kurban edilen sıçanlardan alınmıştır. A: MEPE'den türetilmiş p-ASARM, onarıcı dentin mineralizasyonunu bozar ve MEPE ekspresyonunu artırır. Mikro-bilgisayarlı tomografi (mikro-BT) bölümleri (üst sıra) pulpa odasında pulpa hasarının yakınında (beyaz kesikli kutu anahatları) onarıcı bir işlem (dentin köprüsü oluşumu) olarak meydana gelen mineralizasyonu (oklar) gösterir. Dentin köprüsü, kontrol ve np-ASARM tedavisine kıyasla p-ASARM tedavisinde büyük boşluklarla (mineralizasyon kusurları) daha ince ve düzensiz görünür. Hematoksilen ve eozin (H & E) beyaz kesikli kutularla ana hatları çizilen bölgeden alınan parafin histoloji bölümlerinin (ikinci sıra) boyanması, p-ASARM'a batırılmış boncukların (yıldız işaretleri) yakınındaki dentin köprüsünün (db) düzensiz doğasını gösterir. kontrol ve np-ASARM ile tedavi edilen yaralar. MEPE için immünohistokimya (üçüncü sıra), siyah kesikli kutu anahatlarıyla ayrılmış bölgedeki MEPE (oklar) birikimini sadece p-ASARM tedavisinde onarıcı dentin köprüsünün mineralize olmayan boşluklarında gösterir. Kara kutu ana hatları ile ayrılmış bölgedeki MEPE (alt sıra) için immünohistokimya, dentin köprüsünü salgılayan hücrelerin (odontoblastlar) güçlü MEPE boyamasını gösterir. Kontrol ve np-ASARM ile muamele edilmiş numunelerde, dentin köprüsü homojen ve MEPE için hiç veya zayıf boyama ile görünür. B: Pulpa hacminin kantifikasyonu (dolaylı olarak mineralizasyon hacmini ölçmek için "pulpa dolumu") boncuk implante edilmiş azı dişlerinin mikro-CT'si ile yapıldı. Hamurun global hacmini hesaplamak için

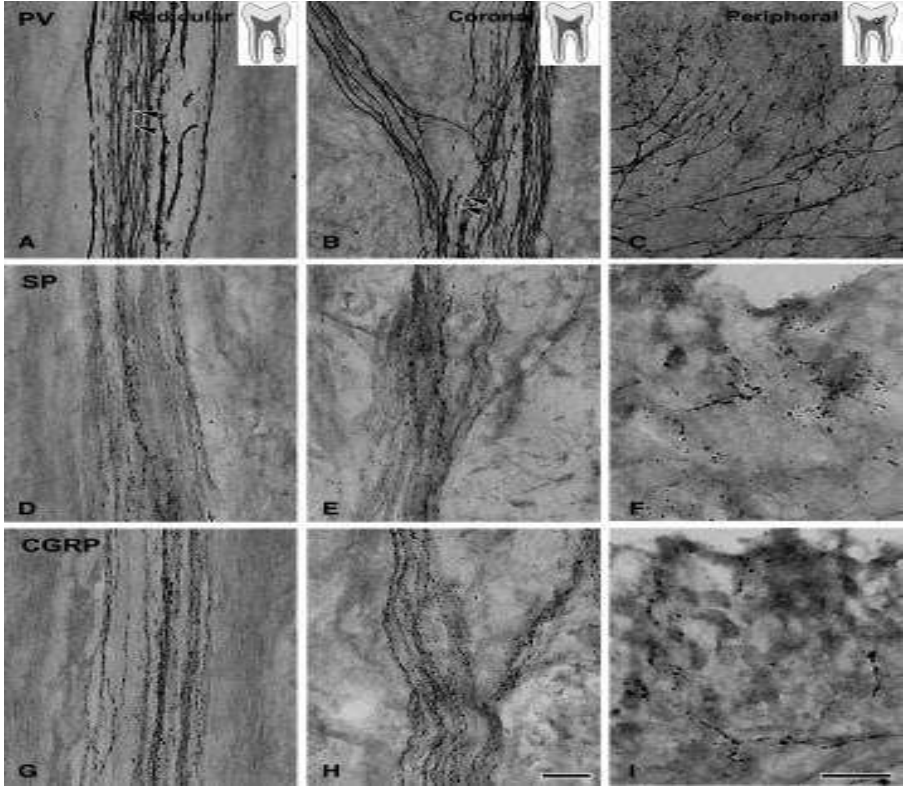
mikro-CT seri bölümlerinden hamurun yarı otomatik segmentasyonu (kırmızı alan) gerçekleştirildi. P-ASARM ile tedavi edilen azı dişlerinden elde edilen pulpa hacmi, kontrol ve np-ASARM tedavisine kıyasla önemli ölçüde daha yüksekti, bu da onarıcı dentin sürecindeki mineralizasyonun p-ASARM tarafından bozulduğunu düşündürmektedir. \* kontrole göre önemli farkı ( $p < 0.05$ ) gösterir. P-ASARM ile tedavi edilen azı dişlerinden elde edilen pulpa hacmi, kontrol ve np-ASARM tedavisine kıyasla önemli ölçüde daha yüksekti, bu da onarıcı dentin sürecindeki mineralizasyonun p-ASARM tarafından bozulduğunu düşündürmektedir. \* kontrole göre önemli farkı ( $p < 0.05$ ) gösterir. P-ASARM ile muamele edilmiş azı dişlerinden elde edilen pulpa hacmi, kontrol ve np-ASARM tedavisine kıyasla önemli ölçüde daha yüksekti, bu da onarıcı dentin sürecindeki mineralizasyonun p-ASARM tarafından bozulduğunu düşündürmekte olup kontrole göre önemli farkı ( $p < 0.05$ ) gösterir [49]. Diş özü yoğun bir şekilde nosiseptif nöronlar tarafından zarar görür; bunların aksonlarla glutamat salma akut nosiseptif ağrı ve patolojik ağrı sinyal mekanizması çok önemli bir parçası olan [50]. Ayrıca konuyu biraz daha açacak olursak diş pulpasına zarar veren trigeminal gangliondaki (TG) duyu nöronlarının büyük çoğunluğu miyelinli (A) liflere ve birkaçı miyelinsiz (C) liflere neden olur [51]. Miyelinli lifler, dentin ve periferik pulpadan kaynaklanan keskin, iğneleyici, iyi lokalize ağrı sinyalinde yer alırken, miyelinsiz lifler, pulpanın kendisinden kaynaklanan donuk, ağrılı, zayıf lokalize ağrı sinyallerinde rol oynar; ilki, dentin duyarlılığında önemli bir rol oynar, ikincisi pulpal inflamatuvar ağrıda önemli bir rol oynar. Pulpa aksonlar sık sık uzunluğu

boyunca birden fazla varisler sergileyen akson büyütülmüş ve çok sayıda veziküller ve mitokondri içerir, kısa bölümler [52]. Ayrıca glutamatın sinaptik veziküllere yüklenmesinde ve salınmasında rol alan iki sınıf protein, veziküler glutamat taşıyıcıları (VGLUT) ve çözünür N- etilmaleimide duyarlı faktör bağlanma protein reseptörleri (SNARE) [53]. Bu bulgular pulpa aksonlarının varislerinden glutamat saldığını göstermektedir. Bu hipotez doğruysa, ana miyelinli aksonlardan ve miyelinsiz aksonlardan kaynaklanan pulpal akson varikozitesinin sıklığı ve uzamsal dağılımı hakkında bilgi toplamak ve bunu nosisepsiyona aracılık etmedeki rolleri hakkında bilinenlerle ilişkilendirmek önemli hale gelir. Bunun için, çoğunlukla ana miyelinli aksonlarda ifade edilen parvalbumin (PV) ve P maddesi (SP) ve kalsitonin ile birlikte VGLUT için ışık mikroskopik immünohistokimya kullanarak insan küçük azı dişlerinden insan diş özündeki varislerin dağılımını araştırdık. trigeminal ganglion duyuşal kökünde çoğunlukla miyelinsiz aksonlarda ifade edilen genle ilgili peptit (CGRP) [54]. PV, SP, CGRP, VGLUT2 ve SNARE proteinleri sözdizimi-1 ve sinaptozomal sinirle ilişkili protein 25'i (SNAP-25) ifade eden varisleri incelemek için elektron mikroskopik ve immünohistokimya teknikleri kullanılmaktadır.



**Şekil 14:** PV + ( A ) ve SP + ve CGRP + ( B ) aksonlarının dağılımını ve bunların insan diş pulpasındaki varislerini gösteren diyagramlar . ( A ) Çoğu PV + akson, periferik pulpada çok sayıda varis gösterirken, birkaç PV + aksonunda radiküler pulpada ve koronal pulpanın çekirdeğinde herhangi bir varyozite bulunur. ( B ) Hemen hemen tüm SP + ve CGRP + aksonları, diş pulpası boyunca eşit olarak varislere sahiptir [55].



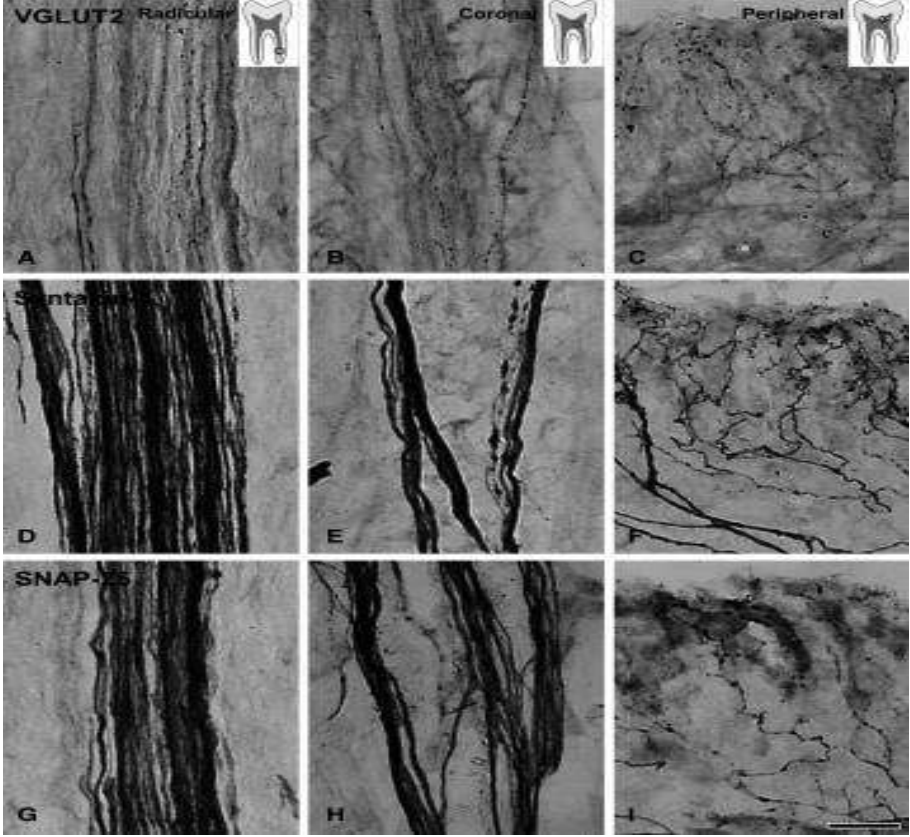


**Şekil 15:** PV + ( A - C ), SP + ( D - F ) ve CGRP + ( G - I ) aksonlarının radiküler ( A , D , G ), koronal ( B , E , H ) çekirdeği ve insan diş özünün periferal ( C , F , I ) bölgeleri. Çoğu PV + akson, periferik pulpada ( C ) çok sayıda varisiteye sahipken, birkaç PV + akson, radiküler pulpada ve koronal pulpanın ( A , B ) çekirdeğinde ara sıra varisler gösterir. Bunun aksine, hemen hemen tüm SP + ve CGRP + aksonları, belirgin bölgesel farklılıklar ( D - I ) olmaksızın diş pulpası boyunca varislere sahiptir . ( A , B ) ' deki ok uçları, koronal pulpanın radiküler ve çekirdeğindeki PV + akson değişkenliklerini gösterir. ( A ), ( B ) ve ( C ) 'deki girintilerdeki dikdörtgenler , ilgili şekillerde temsil edilen hamur

bölgelerini gösterir. Ölçek çubuğu = 20 um (ölçek çubuğu H geçerli olduğu bir , B , D , E , G ve I için geçerlidir C , F) [55].

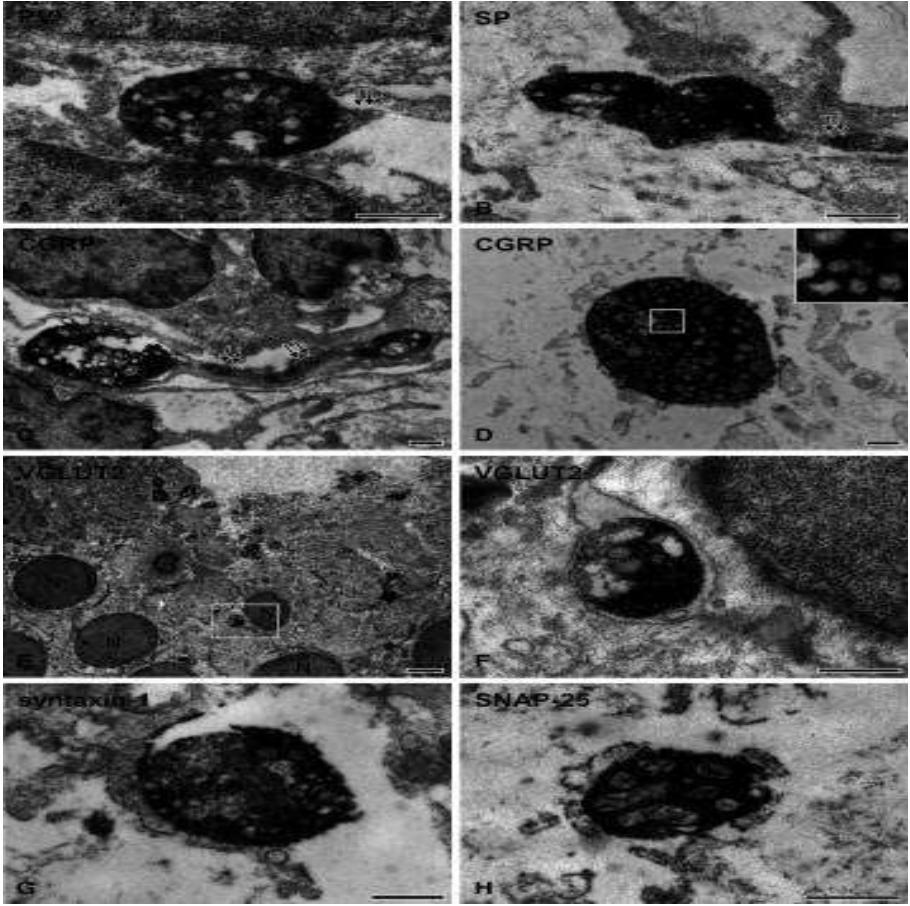
Radiküler pulpadaki ve koronal pulpanın çekirdeğindeki sadece birkaç PV + akson herhangi bir varisiteye sahipken, periferik pulpadaki hemen hemen her PV + akson birden fazla varisite sergilemiştir. Öte yandan SP + ve CGRP + aksonları, bu tür bölgesel farklılıklar göstermedi ve diş pulpası boyunca eşit derecede yoğun varislere sahipti (Şek.(Şekil 1,1, , 2).2). Kantitatif analiz, PV + aksonlarının birim uzunluğu başına varis sayısının, koronal ve radiküler pulpanın çekirdeğine göre periferik pulpada önemli ölçüde daha yüksek olduğunu ortaya çıkarmıştır. Tersine, SP + ve CGRP + aksonları için, üç pulpa bölgesi arasında benzerdi. PV +, SP + ve CGRP + aksonları için birim uzunluk başına varis sayısı periferik pulpada benzer iken, SP + ve CGRP + aksonları için koronal ve radiküler pulpanın çekirdeğindeki PV + aksonlarına göre önemli ölçüde daha yüksekti (Tablo(Tablo 1).1). VGLUT2 +, syntaxin-1 + ve SNAP-25 + aksonlarının periferik pulpada çok sayıda dalı ve varisleri vardır (Şekil. 3). Koronal ve radiküler pulpanın çekirdeğinde, birçok VGLUT2 + aksonu, ancak birkaç sözdizimi-1 + veya SNAP-25 + aksonunda varisler vardı. Ek olarak, çift immünofloresan boyama, SP + ve CGRP + aksonlarının çoğunluğunun ve PV + aksonlarının birkaçının VGLUT2'yi eksprese ettiğini ortaya çıkardı (Şek. 4). VGLUT2 ifade eden SP + (% 32,6 ± 7,8) ve CGRP + (% 39,2 ± 5,9) aksonların oranı, VGLUT2 ifade eden PV + aksonlarından (% 6,2 ± 3,6) önemli ölçüde daha yüksekti. PV + aksonlar, SP veya CGRP için birlikte boyanmadı, bu da diş pulpasında

PV'nin CGRP veya SP'den farklı bir akson tipinde ifade edildiğini düşündürüyor (Şek. 5) [55].



**Şekil 16:** Koronalin çekirdeği olan radikülerdeki ( A , D , G ) VGLUT2 + ( A - C ), sözdizimi-1 + ( D - F ) ve SNAP-25 + ( G - I ) aksonlarının hafif mikrografları ( B , E , H ) ve çevresel ( C , F , I ) insan diş özünün bölgeleri. VGLUT2 +, syntaxin-1 + ve SNAP-25 + aksonlarının çoğu, periferik pulpada çok sayıda varis gösterir. Birçok VGLUT2 + aksonu ve birkaç sözdizimi-1 + ve SNAP-25 + aksonu, koronalin merkezinde ve radiküler pulpada varisler gösterir. Aksonal standlarda ve

demetlerinde VGLUT2, sözdizimi-1 ve SNAP-25 için elektron yoğun immüno-etiketlemenin, nöronal hücre gövdelerinden aksonal varisitelere taşınan proteinleri temsil ettiği varsayılır. VGLUT2 + aksonları , aksonal iplikler ve demetlerdeki ( D - I ) sözdizimi-1 + ve SNAP-25 + için yoğun immün boyamanın aksine zayıf immün boyama ( A - C ) gösterir. Ölçek çubuğu 20 µm ( A - H için geçerlidir ). Elektron mikroskopisinde, miyelinsiz liflerde ve miyelinli liflerin miyelinsiz segmentlerinde aksonal varisler gözlemlendi: Miyelinli lifler, miyelinli olarak dış pulpasına girdi ve ardından miyelini kaybetti. Varisler, ancak aralarındaki aksonal segmentler değil, çok sayıda küçük vezikül ve mitokondri içeriyordu; SP + ve CGRP + aksonlarının varisleri de yoğun çekirdekli büyük veziküller içeriyordu. Nörotransmitterlerin salınması için elverişli bir yapı olabilen Schwann hücreleri, varisiteler tarafından kapsanmadı. PV, SP, CGRP, VGLUT2, sözdizimi-1 ve SNAP-25 için immün boyamanın yoğunluğu, varislerde aksonun ara segmentlerine göre önemli ölçüde daha yüksekti ve olası bir glutamat ve nöropeptid birikimi ve salımı bölgesi olarak varislere işaret ediyor. dış pulpasında (Şek. 6).



**Şekil 17:** İnsan diş pulpasında PV + ( A ), SP + ( B ), CGRP + ( C , D ), VGLUT2 + ( E , F ), sözdizimi-1 + ( G ) ve SNAP-25 + ( H ) aksonal varisleri gösteren elektron mikrografları . İmmünreaksiyon ürünü varisler bakımından yoğundur, ancak aralarındaki aksonal segmentlerde zayıf ve düzensizdir ( A - C'de çift ok ). Varisler çok sayıda küçük vezikül ve mitokondri içerir. CGRP + varislerinin ayrıca nöropeptidler içerdiği düşünülen yoğun çekirdekli büyük veziküller içerdiğine dikkat edin. ( D ) 'deki ekler, ana görüntü içindeki kutulu alanın büyütülmüş halidir. ( F ) ( E ) 'deki kutulu alanın genişlemesidir

ve bir odontoblastın hücre gövdesi ile temas eden bir VGLUT2 + varisitesini gösterir. N, odontoblastın çekirdeğini gösterir. Ölçek çubuğu ( A - D ), ( F - H ) olarak 500 nm ve ( E ) 'de 2 µm .

### **Elektron mikroskop ve immünohistokimya**

Elektron mikroskobu için antikorların penetrasyonunu iyileştirmek için, kesitler gece boyunca PBS içinde% 30 sükröz içinde kriyoproteksiyona tabi tutulmuş, 30 dakika kuru buz üzerinde dondurulmuş ve PBS içinde çözülmüştür. Daha sonra PBS içinde önceden muamele edilmiştir, H, 10 dakika,% 3,% 1 sodyum borohidrid çözümü tamponlu 2 O 210 dakika ve 30 dakika için% 10 NDS. Bundan sonra, kesitler, 1: 1.000'de fare anti-PV'si, 1: 500'de sıçan anti-SP'si, 1: 1.000'de fare anti-CGRP'si, 1'de kobay anti-VGLUT2'si 1: 1.000'de birincil antikor çözeltisine aktarıldı: 500, oda sıcaklığında bir gece boyunca inkübasyon için 1: 2,000'de fare anti-sentaksin-I veya 1: 3,000'de tavşan anti-SNAP-25. PBS'de birkaç durulamadan sonra, kesitler 30 dakika süreyle% 2 NDS'ye ve daha sonra uygun bir biyotinile ikincil antikor, eşek anti-fare, eşek anti-sıçan, eşek anti-kobay veya eşek anti-tavşana 1: 200'de aktarıldı. 2 saat Avidin-biyotin-peroksidaz bağlanması, ExtrAvidin peroksidaz (Sigma-Aldrich) ile 1 saat süreyle 1: 5.000'de yapıldı ve peroksidaz, standart bir diaminobenzidin (DAB) protokolüne göre açığa çıkarıldı. PB içinde% 1 osmiyum tetroksitte 1 saat daha boyandıktan sonra, immüno boyanmış bölümler, bir dizi etanol seyreltisi ile dehidre edildi ve Durcupan ACM (Fluka, Buchs, İsviçre) içine gömüldü. Reçine, 60 ° C'lik bir fırında 48 saat süreyle kürlendi. Gömülü dokunun bir mm<sup>2</sup>'lik

yongaları kesildi ve siyanoakrilat ile destek reçine blokları üzerine yapıştırıldı. Elmas ultramikrotom bıçağıyla (Dupont) kesilmiş ince kesitler, formvar kaplı Ni ızgaralara seri olarak monte edildi ve ızgaralar, uranil asetat ve kurşun sitrat ile zıt boyandı ve bir Hitachi H-7500 elektron mikroskobunda (Hitachi, Tokyo, Japonya ) 80 kV'de. Fotomikrograflar bir SC1000 CCD kamera (Gatan, Pleasanton, CA) ile çekilmiş ve DigitalMicrograph yazılımı kullanılarak TIFF dosyaları olarak kaydedilmiştir. Gömülü dokunun bir mm<sup>2</sup>'lik yongaları kesildi ve siyanoakrilat ile destek reçine blokları üzerine yapıştırıldı. Elmas ultramikrotom bıçağıyla (Dupont) kesilmiş ince kesitler, formvar kaplı Ni ızgaralara seri olarak monte edildi ve ızgaralar, uranil asetat ve kurşun sitrat ile zıt boyandı ve bir Hitachi H-7500 elektron mikroskobunda (Hitachi, Tokyo, Japonya ) 80 kV'de. Fotomikrograflar bir SC1000 CCD kamera (Gatan, Pleasanton, CA) ile çekilmiş ve DigitalMicrograph yazılımı kullanılarak TIFF dosyaları olarak kaydedilmiştir. Gömülü dokunun bir mm<sup>2</sup>'lik yongaları kesildi ve siyanoakrilat ile destek reçine blokları üzerine yapıştırıldı. Elmas ultramikrotom bıçağıyla (Dupont) kesilmiş ince kesitler, formvar kaplı Ni ızgaralara seri olarak monte edildi ve ızgaralar, uranil asetat ve kurşun sitrat ile zıt boyandı ve bir Hitachi H-7500 elektron mikroskobunda (Hitachi, Tokyo, Japonya ) 80 kV'de. Fotomikrograflar bir SC1000 CCD kamera (Gatan, Pleasanton, CA) ile çekilmiş ve DigitalMicrograph yazılımı kullanılarak TIFF dosyaları olarak kaydedilmiştir. formvar kaplı Ni ızgaralar üzerine seri olarak monte edildi ve ızgaralar, uranil asetat ve kurşun sitrat ile zıt boyandı ve 80 kV'de bir Hitachi H-7500 elektron mikroskobunda (Hitachi, Tokyo,

Japonya) incelendi. Fotomikrograflar bir SC1000 CCD kamera (Gatan, Pleasanton, CA) ile çekilmiş ve DigitalMicrograph yazılımı kullanılarak TIFF dosyaları olarak kaydedilmiştir. formvar kaplı Ni ızgaralar üzerine seri olarak monte edildi ve ızgaralar, uranil asetat ve kurşun sitrat ile zıt boyandı ve 80 kV'de bir Hitachi H-7500 elektron mikroskobunda (Hitachi, Tokyo, Japonya) incelendi. Fotomikrograflar bir SC1000 CCD kamera (Gatan, Pleasanton, CA) ile çekilmiş ve DigitalMicrograph yazılımı kullanılarak TIFF dosyaları olarak kaydedilmiştir.

### **İmmünohistokimyasal kontroller**

Bu çalışmada kullanılan tüm antikolar laboratuvarımızda kullanılmış ve özgüllükleri önceki deneyler [54,56,57]'da doğrulanmıştır. Yine de, birincil veya ikincil antikoları atladığımız bölümleri rutin olarak işledik. Birincil veya ikincil antikolar olmadan inkübe edilen bölümler, tamamen spesifik boyamadan yoksundu. Ayrıca, ilgili tedarikçinin protokolüne göre bloke edici peptitlerle ön adsorpsiyondan sonra immüno-boyamalı kesitler: örneğin, 18 ug / mL PV bloke edici peptit ile inkübe edilen kısımlarda, PV için spesifik immün boyama yoktu. Elektron mikroskobu ile, bitişik seri ince kesitlerde immün boyamayı inceledik: aynı doku elemanlarının seri kesitlerinde tutarlı boyama, spesifikliğı doğruladı.



## **KAYNAKLAR**

1. Anitua E, Troya M, Zalduendo M. Progress in the use of dental pulp stem cells in regenerative medicine. *Cytotherapy*. 2018 Apr;20(4):479-498.
2. Ledesma-Martínez E, Mendoza-Núñez VM, Santiago-Osorio E. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. *Stem Cells Int*. 2016;2016:4709572.
3. Nuti N, Corallo C, Chan BM, et al. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem Cell Rev Rep*. 2016 Oct;12(5):511-523.
4. Liu Z, Tang M, Zhao J, et al. Looking into the Future: Toward Advanced 3D Biomaterials for Stem-Cell-Based Regenerative Medicine. *Adv Mater*. 2018 Apr;30(17):e1705388.
5. Martino S, D'Angelo F, Armentano I, et al. Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine. *Biotechnol Adv*. 2012 Jan-Feb;30(1):338-51.
6. Daviran M, Caram HS, Schultz KM. Role of Cell-Mediated Enzymatic Degradation and Cytoskeletal Tension on Dynamic Changes in the Rheology of the Pericellular Region Prior to Human Mesenchymal Stem Cell Motility. *ACS Biomater Sci Eng*. 2018 Feb 12;4(2):468-472.
7. Kim J, Kim IS, Cho TH, et al. In vivo evaluation of MMP sensitive high-molecular weight HA-based hydrogels for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Dec 1;95(3):673-81.

8. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009 Sep;88(9):792-806.
9. Li Y, Wu Q, Wang Y, et al. Senescence of mesenchymal stem cells (Review). *Int J Mol Med.* 2017 Apr;39(4):775-782.
10. Alraies A, Canetta E, Waddington RJ, et al. Discrimination of Dental Pulp Stem Cell Regenerative Heterogeneity by Single-Cell Raman Spectroscopy. *Tissue Eng Part C Methods.* 2019 Aug;25(8):489-499.
11. Alraies A, Alaidaroos NY, Waddington RJ, et al. Variation in human dental pulp stem cell ageing profiles reflect contrasting proliferative and regenerative capabilities. *BMC Cell Biol.* 2017 Feb 2;18(1):12.
12. Chowdhury SR, Mh Busra MF, Lokanathan Y, et al. Collagen Type I: A Versatile Biomaterial. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1077:389-414.
13. Stephens P, Davies KJ, al-Khateeb T, et al. A comparison of the ability of intra-oral and extra-oral fibroblasts to stimulate extracellular matrix reorganization in a model of wound contraction. *J Dent Res.* 1996 Jun;75(6):1358-64.
14. Azzam HS, Thompson EW. Collagen-induced activation of the M(r) 72,000 type IV collagenase in normal and malignant human fibroblastoid cells. *Cancer Res.* 1992 Aug 15;52(16):4540-4.

15. Moreno-Arotzena O, Meier JG, Del Amo C, et al. Characterization of Fibrin and Collagen Gels for Engineering Wound Healing Models. *Materials (Basel)*. 2015 Apr 1;8(4):1636-1651.
16. Alraies A, Waddington RJ, Sloan AJ, et al. Evaluation of Dental Pulp Stem Cell Heterogeneity and Behaviour in 3D Type I Collagen Gels. *Biomed Res Int*. 2020;2020:3034727.
17. Elsalanty ME, Genecov DG. Bone grafts in craniofacial surgery. *Cranio-maxillofac Trauma Reconstr*. 2009 Oct;2(3):125-34.
18. Behnia H, Khojasteh A, Kiani MT, et al. Bone regeneration with a combination of nanocrystalline hydroxyapatite silica gel, platelet-rich growth factor, and mesenchymal stem cells: a histologic study in rabbit calvaria. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013 Feb;115(2):e7-15.
19. Tatullo M, Marrelli M, Shakesheff KM, et al. Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015 Nov;9(11):1205-16.
20. Hilkens P, Meschi N, Lambrechts P, et al. Dental Stem Cells in Pulp Regeneration: Near Future or Long Road Ahead? *Stem Cells Dev*. 2015 Jul 15;24(14):1610-22.
21. Tabatabaei FS, Motamedian SR, Gholipour F, et al. Cranio-maxillofacial bone engineering by scaffolds loaded with stem cells: A systematic review. *J Dent Sch*. 2012;30(2):115-131.

22. Khojasteh A, Motamedian SR, Rad MR, et al. Polymeric vs hydroxyapatite-based scaffolds on dental pulp stem cell proliferation and differentiation. *World J Stem Cells*. 2015 Nov 26;7(10):1215-21.
23. Aurrekoetxea M, Garcia-Gallastegui P, Irastorza I, et al. Dental pulp stem cells as a multifaceted tool for bioengineering and the regeneration of craniomaxillofacial tissues. *Front Physiol*. 2015;6:289.
24. Petrou MA, Alhamoui FA, Welk A, et al. A randomized clinical trial on the use of medical Portland cement, MTA and calcium hydroxide in indirect pulp treatment. *Clin Oral Investig*. 2014;18(5):1383-9.
25. Ohnishi T, Bandow K, Kakimoto K, et al. Long-time treatment by low-dose N-acetyl-L-cysteine enhances proinflammatory cytokine expressions in LPS-stimulated macrophages. *PLoS One*. 2014;9(2):e87229.
26. Pan H, Shen Z, Mukhopadhyay P, et al. Anaphylatoxin C5a contributes to the pathogenesis of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009 Mar;296(3):F496-504.
27. Széplaki G, Varga L, Füst G, et al. Role of complement in the pathomechanism of atherosclerotic vascular diseases. *Mol Immunol*. 2009 Sep;46(14):2784-93.
28. Hornum L, Hansen AJ, Tornehave D, et al. C5a and C5aR are elevated in joints of rheumatoid and psoriatic arthritis patients,

- and C5aR blockade attenuates leukocyte migration to synovial fluid. *PLoS One*. 2017;12(12):e0189017.
29. Wang R, Xiao H, Guo R, et al. The role of C5a in acute lung injury induced by highly pathogenic viral infections. *Emerg Microbes Infect*. 2015 May;4(5):e28.
  30. Lara-Astiaso D, Izarra A, Estrada JC, et al. Complement anaphylatoxins C3a and C5a induce a failing regenerative program in cardiac resident cells. Evidence of a role for cardiac resident stem cells other than cardiomyocyte renewal. *Springerplus*. 2012 Dec;1(1):63.
  31. Ignatius A, Ehrnthaller C, Brenner RE, et al. The anaphylatoxin receptor C5aR is present during fracture healing in rats and mediates osteoblast migration in vitro. *J Trauma*. 2011 Oct;71(4):952-60.
  32. Chmilewsky F, Ayaz W, Appiah J, et al. Nerve Growth Factor Secretion From Pulp Fibroblasts is Modulated by Complement C5a Receptor and Implied in Neurite Outgrowth. *Sci Rep*. 2016 Aug 19;6:31799.
  33. Jeanneau C, Rufas P, Rombouts C, et al. Can Pulp Fibroblasts Kill Cariogenic Bacteria? Role of Complement Activation. *J Dent Res*. 2015 Dec;94(12):1765-72.
  34. Chmilewsky F, Jeanneau C, Laurent P, et al. Pulp fibroblasts synthesize functional complement proteins involved in initiating dentin-pulp regeneration. *Am J Pathol*. 2014 Jul;184(7):1991-2000.

35. Maintaining and improving the oral health of young children. *Pediatrics*. 2014 Dec;134(6):1224-9.
36. Jiang W, Lv H, Wang H, et al. Activation of the NLRP3/caspase-1 inflammasome in human dental pulp tissue and human dental pulp fibroblasts. *Cell Tissue Res*. 2015 Aug;361(2):541-55.
37. Elsalhy M, Azizieh F, Raghupathy R. Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *Int Endod J*. 2013 Jun;46(6):573-80.
38. Liu M, Mu H, Peng W, et al. Time-dependent C5a and C5aR expression in dental pulp cells following stimulation with LTA and LPS. *Int J Mol Med*. 2019 Sep;44(3):823-834.
39. Ivica A, Ghayor C, Zehnder M, et al. Pulp-Derived Exosomes in a Fibrin-Based Regenerative Root Filling Material. *J Clin Med*. 2020 Feb 11;9(2).
40. Manolea H, Vasile N, Opri M, et al. Immunohistochemical and electron microscopy aspects of the nerve structures from the dental pulp. *Rom J Morphol Embryol*. 2014;55(1):147-52.
41. Albuquerque MT, Valera MC, Nakashima M, et al. Tissue-engineering-based strategies for regenerative endodontics. *J Dent Res*. 2014 Dec;93(12):1222-31.
42. Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *J Endod*. 2013 Mar;39(3 Suppl):S30-43.
43. Damle SG, Bhattal H, Loomba A. Apexification of anterior teeth: a comparative evaluation of mineral trioxide aggregate

- and calcium hydroxide paste. *J Clin Pediatr Dent.* 2012 Spring;36(3):263-8.
44. Diogenes AR, Ruparel NB, Teixeira FB, et al. Translational science in disinfection for regenerative endodontics. *J Endod.* 2014 Apr;40(4 Suppl):S52-7.
  45. Chuensombat S, Khemaleelakul S, Chattipakorn S, et al. Cytotoxic effects and antibacterial efficacy of a 3-antibiotic combination: an in vitro study. *J Endod.* 2013 Jun;39(6):813-9.
  46. Palasuk J, Kamocki K, Hippenmeyer L, et al. Bimix antimicrobial scaffolds for regenerative endodontics. *J Endod.* 2014 Nov;40(11):1879-84.
  47. Mohmmmed SA, Vianna ME, Penny MR, et al. Confocal laser scanning, scanning electron, and transmission electron microscopy investigation of *Enterococcus faecalis* biofilm degradation using passive and active sodium hypochlorite irrigation within a simulated root canal model. *Microbiologyopen.* 2017 Aug;6(4).
  48. Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13;100(10):5807-12.
  49. Salmon B, Bardet C, Khaddam M, et al. MEPE-derived ASARM peptide inhibits odontogenic differentiation of dental pulp stem cells and impairs mineralization in tooth models of X-linked hypophosphatemia. *PLoS One.* 2013;8(2):e56749.
  50. Lam DK, Sessle BJ, Hu JW. Glutamate and capsaicin effects on trigeminal nociception I: Activation and peripheral sensitization

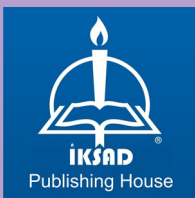
- of deep craniofacial nociceptive afferents. *Brain Res.* 2009 Jan 28;1251:130-9.
51. Paik SK, Park KP, Lee SK, et al. Light and electron microscopic analysis of the somata and parent axons innervating the rat upper molar and lower incisor pulp. *Neuroscience.* 2009 Sep 15;162(4):1279-86.
  52. Kim YS, Kim TH, McKemy DD, et al. Expression of vesicular glutamate transporters in transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8)-positive dental afferents in the mouse. *Neuroscience.* 2015 Sep 10;303:378-88.
  53. Honma S, Kadono K, Kawano A, et al. Immunohistochemical localization of SNARE core proteins in intrapulpal and intradental nerve fibers of rat molar teeth. *Arch Oral Biol.* 2017 Jan;73:248-252.
  54. Bae JY, Mun CJ, Kim YS, et al. Quantitative ultrastructural analysis of fibers expressing parvalbumin, calretinin, calbindin D-28k, stage specific embryonic antigen-4, and phosphorylated neurofilament 200 in the peripheral sensory root of the rat trigeminal ganglion. *J Comp Neurol.* 2018 Oct 1;526(14):2204-2214.
  55. Park SK, Choi SK, Kim YG, et al. Parvalbumin-, substance P- and calcitonin gene-related peptide-immunopositive axons in the human dental pulp differ in their distribution of varicosities. *Sci Rep.* 2020 Jun 30;10(1):10672.



56. Kim TH, Park SK, Choi SY, et al. Morphologic Change of Parvalbumin-positive Myelinated Axons in the Human Dental Pulp. *J Endod.* 2017 Jun;43(6):977-981.
57. Kim YS, Kim SK, Lee JS, et al. Expression of vesicular glutamate transporters in transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)-positive neurons in the rat trigeminal ganglion. *Brain Res.* 2018 Jul 1;1690:31-39.







ISBN: 978-625-8213-54-6