

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

Tomasz Nowak

**Skład pierwiastkowy tkanek twardych zęba oraz ocena
komórek prozapalnych i włókien nerwowych w przebiegu
zębopochodnych procesów zapalnych okolicy
okołowierzchołkowej**

Praca doktorska

Promotor: prof. dr hab. med. Roman Pawlicki,

Pracę wykonano w

Katedrze i Zakładzie Histologii UJ CM Kraków

Kierownik: prof. dr hab. Jan A. Litwin

oraz w

Zakładzie Chirurgii Stomatologicznej Instytutu Stomatologii UJ CM

Kierownik: dr n. med. Małgorzata Zaleska

Kraków 2010

Składam serdeczne podziękowania

*Promotorowi Profesorowi dr hab. med. Romanowi Pawlickiemu za
poniesiony trud oraz za wnikliwe uwagi i wsparcie, okazywaną mi
życzliwość i opiekę naukową.*

*Pani Profesor dr hab. med. Zofii Knychalskiej-Karwan za cenne i
życzliwe wskazówki oraz wsparcie podczas realizacji pracy.*

*Panu Profesorowi dr hab. Janowi Litwinowi za umożliwienie
przeprowadzenia niezbędnych badań w Katedrze Histologii UJ CM*

*Panu dr n. med. Mariuszowi Gajdzie za nieocenioną pomoc podczas
wykonywanych barwień histologicznych.*

*Pani dr n. med. Małgorzacie Zaleskiej za umożliwienie zebrania
materiału do badań w Zakładzie Chirurgii Stomatologicznej UJ CM*

SPIS TREŚCI

I. Wstęp.....	5
1. Charakterystyka okolicy okołowierzchołkowej zęba.....	5
2. Charakterystyka włókien nerwowych zaopatrujących miazgę zęba.....	6
3. Grupy włókien nerwowych biorące udział w unerwieniu zębów.....	10
4. Funkcje poszczególnych włókien nerwowych.....	11
5. Charakterystyka znaczników biorących udział w przewodzeniu bodźców nerwowych.....	22
6. Charakterystyka procesów zapalnych okolicy okołowierzchołkowej zęba....	26
7. Charakterystyka markerów reakcji zapalnej.....	32
8. Charakterystyka markerów włókien nerwowych.....	34
II. Cele pracy.....	39
III. Materiał.....	40
IV. Metody.....	41
1. Roztwory zastosowane w preparatyce.....	41
2. Preparatyka histologiczna.....	41
3. Barwienia histologiczne.....	42
4. Reakcje immunohistochemiczne.....	42
5. Obserwacja mikroskopowa i dokumentacja preparatów immunohistochemicznych.....	43
6. Badania w SEM oraz mikrosondzie RTG.....	43
V. Wyniki.....	45
1. Charakterystyka kliniczna przypadków.....	45

2. Ocena komórek pozapalnych.....	48
3. Ocena włókien nerwowych.....	51
4. Skład pierwiastkowy tkanek zęba.....	54
VI. Omówienie wyników i dyskusja.....	56
1. Ocena komórek prozapalnych.....	56
2. Ocena włókien nerwowych.....	59
3. Ocena zmian składu pierwiastkowego.....	63
VII. Wnioski.....	65
VIII. Streszczenie.....	67
IX. Summary.....	74
X. Tabele.....	80
XI. Fotografie.....	96
Piśmiennictwo.....	104

I. Wstęp

1. Charakterystyka okolicy okołowierzchołkowej zęba

W skład tkanek okołowierzchołkowych zęba, stanowiących część jego aparatu zawieszeniowego, wchodzi ozębna wraz z więzadłami i kość wyrostka zębodołowego, w okolicy tej znajduje się również cement pokrywający korzeń zęba będący elementem składowym wierzchołka zęba (1). Ozębna utworzona przez tkankę łączną wypełnia wąską przestrzeń i znajduje się pomiędzy korzeniem zęba a kością zębodołu. Grubość ozębnej wynosi około 0,3 mm. W obrębie tej struktury znajdują się dwa typy tkanki łącznej: tkanka łączna zbita, tworząca więzadła zęba oraz tkanka łączna wiotka bogata w komórki, poprzez którą przebiegają naczynia i nerwy.

Taki skład tkankowy warunkuje dwie zasadnicze funkcje w stosunku do struktur otaczających – mechaniczną, mocującą ząb w zębodole oraz metaboliczną, odżywiająca cement pokrywający korzeń zęba oraz kość zębodołu.

Okołowierzchołkowa część ozębnej jest strukturą bogato unaczynioną oraz unerwioną. Naczynia włosowate tej okolicy mają kręty przebieg i tworzą poszerzone pętle końcowe. Ponadto w tej części aparatu zawieszeniowego zęba znajduje się obfita ilość wiotkiej tkanki łącznej. W jej skład wchodzi komórki cemento- i osteogenne, cementoklasty i osteoklasty oraz fibroblasty. Komórki te uczestniczą w przebudowie cementu korzeniowego, kości zębodołu oraz więzadeł utrzymujących ząb. Spotyka się tu także w zmiennej ilości mastocyty, makrofagi, limfocyty, granulocyty oraz nieliczne komórki Malasseza.

W okolicy wierzchołkowej znajduje się otwór wierzchołkowy zęba, przez który do kanału zęba wnikają naczynia krwionośne, naczynia limfatyczne oraz włókna nerwowe (1).

2. Charakterystyka włókien nerwowych zaopatrujących miazgę zęba

Miazga zęba to miękka tkanka mezenchymalna gęsto unerwiona przez włókna aferentne, współczulne oraz w pewnej mierze przez włókna układu przywspółczulnego – chociaż ten typ unerwienia miazgi jest wciąż dyskutowany. Unerwienie zęba powinno być rozpatrywane jako część większego aparatu sensorycznego, w skład którego wchodzi włókna nerwowe ozębnej, dziąsła i wargi.

Błonę ozębną zaopatrują dwie fizjologiczne populacje włókien nerwowych: aferentne włókna czuciowe oraz włókna układu autonomicznego (2). Najliczniejsze są aferentne włókna czuciowe docierające do ozębnej w głównej mierze drogą dwóch gałęzi nerwu trójdzielnego: V2 – nerwu szczękowego dla zębów szczęki oraz V3 – nerwu żuchwowego dla zębów żuchwy.

Bodźce dośrodkowe prowadzone są częścią większą nerwu trójdzielnego. Ciała komórkowe tych włókien zlokalizowane są w zwoju trójdzielnym. Ze zwoju tego wychodzą trzy gałęzie nerwu trójdzielnego: nerw oczny, nerw szczękowy oraz nerw żuchwowy.

Zęby szczęki unerwione są przez włókna nerwowe pochodzące ze splotu zębowego górnego. Splot ten - utworzony przez gałęzie zębodołowe górne tylne,

środkową oraz przednie – zaopatruje błonę śluzową zatoki szczękowej, zęby szczęki i przylegającą błonę śluzową dziąsła.

Zęby żuchwy unerwione są za pośrednictwem gałęzi zębowych dolnych odchodzących od splotu zębowego dolnego położonego w kanale żuchwy. Splot ten utworzony jest przez włókna nerwowe nerwu zębodołowego dolnego, będącego gałęzią nerwu żuchwowego. Ponadto dolne zęby sieczne oraz trzonowe mogą otrzymywać niestale unerwienie dodatkowe od gałęzi nerwu żuchwowo-gnykowego (2). Dodatkowo nerwy językowy, policzkowy oraz uszno-skroniowy oddają niestale gałęzie mogące w ograniczonym zakresie zaopatrywać zęby (2).

Drugą populację włókien nerwowych docierających do miazgi zęba stanowią włókna układu autonomicznego – głównie postsynaptyczne, wywodzące się z komórek szyjnych splotów pnia sympatycznego, a docierające wzdłuż naczyń krwionośnych (1). Włókna te w obrębie miazgi zęba przebiegają wspólnie z naczyniami krwionośnymi a następnie tworzą obfite sploty w warstwie odontoblastów i warstwie pododontoblastycznej (3).

Udział włókien przywspółczulnych w unerwieniu miazgi zębów jest sprawą kontrowersyjną. Wyniki w dostępnej literaturze nie wskazują jednoznacznie na brak bądź istnienie tego typu unerwienia (4,5).

Cienkie pęczki włókien nerwowych, zarówno zmielinizowanych jak i niezmielinizowanych, dochodzą od pnia nerwu do okolicy okołowierzchołkowej zęba drogą drobnych kanałów odżywczych w kości. Część włókien zmierza wprost do

otworu wierzchołkowego zęba oddając jedynie nieliczne odgałęzienia do ozębnej okolicy okołowierzchołkowej. Pozostałe włókna nie przebiegają bezpośrednio w kierunku kanału zęba a oddają gałęzie w kierunku przyzębia brzeżnego (6). Takie rozmieszczenie topograficzne zwiększą gęstość włókien nerwowych okolicy okołowierzchołkowej w porównaniu z wyższymi rejonami ozębnej (2). W błonie ozębnej, w przeciwieństwie do miazgi zęba, oprócz wolnych zakończeń nerwowych spotyka się także korpuskularne receptory czucia (głównie ciała Ruffiniego) rejestrujące miejscowy ucisk (1). Ponadto włókna nerwowe znajdujące się w błonie ozębnej różnią się od włókien zaopatrujących miazgę zęba: przeważają tu szybko przewodzące włókna odpowiedzialne za odczucia mechaniczne, podczas gdy w miazdze zęba znajdują się w głównej mierze włókna odpowiedzialne za przewodzenie bodźców bólowych (6).

Niezależnie od typu włókna nerwowe wnikają do miazgi zęba poprzez otwór wierzchołkowy w formie kilkunastu do kilkuset pęczków oraz przez otwory dodatkowe zlokalizowane zarówno w okolicy wierzchołkowej zęba jak i w wyższych częściach jego korzenia. Te pęczki nerwowe na swoim przebiegu wzdłuż kanału korzeniowego zęba oddają nieliczne odgałęzienia.

Niektóre pęczki nerwowe ulegają podziałowi w okolicy szyjki zęba i biegną w kierunku warstwy odontoblastów, gdzie się kończą, jednak większość włókien w koronowej części miazgi tworzy splot pododontoblastyczny Raszkowa (7). Z tego miejsca aksony nerwów sięgają do regionu zajmowanego przez odontoblasty i tworzą następnie drugi splot w obrębie miazgi zęba znajdujący się na granicy miazgowo-zębinowej (2).

Ponadto reszta włókien nerwowych kończy swój przebieg jako wolne włókna biegnące 1) wzdłuż naczyń krwionośnych, 2) w warstwie odontoblastów, 3) w przębinie lub w 4) początkowych odcinkach kanalików zębinowych.

Czuciowe włókna nerwowe wnikają, jako wolne zakończenia (włókna bezmielinowe), do początkowych odcinków kanalików zębinowych nieprzekraczających – w oparciu o literaturę od 125 μm (7) do 0.2 mm długości (3,7). Pojedynczy pęczek włókien nerwowych pochodzący z miazgi może wnikać nawet do 100 kanalików zębinowych (2). Włókna nerwowe komórek czuciowych w okolicy pododontoblastycznej, szczególnie obfite w okolicach odpowiadających rogom miazgi tworzą sploty a następnie wnikają do kanalików zębinowych. Nie wykazano jakichkolwiek połączeń pomiędzy zakończeniami nerwowymi zlokalizowanymi w kanalikach zębinowych, a wypustkami odontoblastów. Jednocześnie brak jest włókien autonomicznych (współczulnych) w obrębie kanalików zębinowych - jednakże nie wiadomo czy włókien tych nie ma w obrębie kanalików zębinowych czy nie udało się ich do tej pory wykazać.

Obecność autonomicznych włókien nerwowych w obrębie kanalików zębiny jest informacją ważną klinicznie, ponieważ włókna te mają możliwość modulacji odpowiedzi bólowej poprzez łączenie się z włóknami czuciowymi i aktywację α -adenoreceptorów. Tak więc mógłby to być jeden z mechanizmów odpowiedzialnych za często występującą nadwrażliwość zębiny (3).

Unerwienie wewnętrznych części zębiny w obrębie zęba jest niejednorodne: największa ilość włókien znajduje się w obrębie szyjki zęba, następnie dużo włókien wnika w głąb zębiny w okolicy rogów miazgi.

Uważa się, że zębina koronowa jest unerwiona, podczas gdy zębina korzeniowa nie posiada włókien nerwowych (7). Nie odnaleziono też włókien nerwowych w obrębie zębiny międzykorzeniowej oraz trzeciorzędowej (8).

3. Grupy włókien nerwowych biorące udział w unerwieniu zębów

Miazga ludzkich zębów odpowiada na każdy typ bodźca w sposób jednakowy – bólem. Natężenie tego bólu zależy od częstości działania impulsów pobudzających, ilości włókien nerwowych zlokalizowanych w sąsiedztwie działania bodźca oraz od typu pobudzanych włókien nerwowych.

Zęby unerwiane są przez włókna grupy A ($A\delta$ – włókna zarówno dużej jak i małej średnicy; $A\beta$) oraz grupy C. Podział włókien nerwowych na grupy wynika z ich średnicy i obecności osłonki mielinowej, a co za tym idzie szybkości przewodzenia impulsów nerwowych (Tabela 1). Zmielinizowane włókna grupy A odpowiadają za przewodzenie silnych, dobrze zlokalizowanych bodźców bólowych oraz za uczucie ucisku czy rozpierania. Cienkie, niezmielinizowane włókna C są odpowiedzialne za odczuwanie tępego, słabo zlokalizowanego bólu. Ponad 93% zmielinizowanych włókien wnikających do miazgi zębowej to cienkie włókna typu $A\delta$ (8). W skład niezmielinizowanych włókien wchodzi zarówno cienkie włókna czuciowe typu C (o średnicy $0,5 \mu\text{m}$), jak i współczulne włókna autonomicznego układu nerwowego.

Włókna grupy A są w większości zlokalizowane na obwodzie miazgi, w okolicy granicy miazgowo-zębinowej (9). Większość z tych włókien znajduje się w koronowej części miazgi, największe zagęszczenie występuje w rejonach rogów miazgi. Włókna grupy C znajdują się wewnątrz miazgi, zmierzając do stref bogatokomórkowych (9). W dostępnej literaturze nie napotkano na wyniki badań opisujących procentowy stosunek włókien typu A i C.

Włókna A δ oraz C przewodzą sygnały bólowe różnymi drogami do różnych obszarów wzgórza. Włókna C kończą się w obrębie jądra ogoniastego oraz w jądrach śródblaszkowych wzgórza (9). Ze wzgórza impulsy nerwowe doprowadzane przez włókna grupy C są przesyłane dalej do podwzgórza oraz kory mózgu. Włókna A δ docierają również w obręb jądra ogoniastego i następnie aktywują centralną drogę przewodzenia bólu, która kończy się w najbardziej ogonowej części brzuszno-podstawnego zespołu wzgórza (9). Stąd impulsy są przesyłane do innych obszarów wzgórza oraz do kory somatyczno-czuciowej mózgu.

4. Funkcje poszczególnych włókien nerwowych

Włókna nerwowe zaopatrujące miazgę zębową pełnią następujące główne funkcje:

-*czuciową* – przekazując bodźce bólowe w sytuacjach patologicznych prowadzących do uszkodzenia tkanek twardych oraz miękkich zęba jak również tkanek ozębnej oraz zapewniając ośrodkowemu układowi nerwowemu (OUN) informację o przestrzennym położeniu zębów, o sile nagryzania oraz o wzajemnym stosunku szczęk i

zuchwy do siebie (czucie proprioceptywne) jak również o stanie tkanek zęba i oszębnej

-naczyniowo-ruchową - odpowiadając za ilość dopływającej krwi do miazgi zęba (włókna układu autonomicznego), co zapewnia prawidłowe odżywienie komórek miazgi, usuwanie produktów przemian metabolicznych, utrzymanie prawidłowego ciśnienia w naczyniach krwionośnych i korelację tego ciśnienia z ciśnieniem tkankowym miazgi, uwalnianie poszczególnych neuromediatorów, mediatorów reakcji zapalnych, itp.

Funkcja czuciowa odpowiadająca za przewodzenie bodźców bólowych (nocycepcja) jest zasadniczo realizowana za pośrednictwem cienkich zmielinizowanych włókien typu A oraz niezmielinizowanych włókien typu C. Wolne zakończenia odpowiednich typów włókien nerwowych zlokalizowane w poszczególnych rejonach zęba posiadają swoje ściśle określone funkcje.

Te, które są zlokalizowane w obrębie zębiny odpowiadają za ból powstający podczas jej nawiercania, osuszania powietrzem, działania czynników chemicznych oraz występujący w przebiegu procesów patologicznych tej tkanki. Są to głównie włókna zmielinizowane, z których wiele wykazuje immunoreaktywność w kierunku CGRP (10). Włókna, które są zlokalizowane prostopadle do kanalików zębinowych stanowią największe zakończenia nerwowe i pochodzą z aksonów typu A β lub większych typu A δ . Czasami są one częścią rozległej sieci czuciowej, której zakończenia wnikają również w obręb splotów pododontoblastycznego, odontoblastycznego oraz w obręb kanalików zębiny (11). Ponadto, za pośrednictwem mechanoreceptorów związanych z

włóknami $A\beta$, które biorą udział w przewodzeniu doznań związanych z wibracjami, dochodzi do odczuwania bodźców nie posiadających charakteru bólowego, np. występujących podczas aktu żucia czy działając jako „przed-bólowe” zabezpieczenie przed urazem miazgi (12,13).

W obrębie miazgi znajdują się głównie włókna grupy C oraz nieliczne polimodalne zakończenia grupy $A\delta$ (14). Włókna grupy C odpowiadają za przewodzenie bodźców bólowych oraz doznań powstających pod wpływem czynników chemicznych: bradykininy, histaminy, KCl, kapsaicyny. Organizacja strukturalna poszczególnych typów włókien nerwowych w zakresie miazgi nie koreluje z ich właściwościami funkcjonalnymi (14).

Mechanizmy odczuwania bólu przez zakończenia nerwowe w miazdze zębów są procesem złożonym, poszczególne bodźce mogą aktywować jeden lub kilka typów włókien nerwowych. Ponadto w obrębie miazgi zęba znajdują się nie tylko wolne zakończenia poszczególnych typów włókien nerwowych, ale również liczne receptory systemu polimodalnego, które przekazują bodźce czuciowe zarówno za pośrednictwem włókien typu C jak i typu A. Polimodalny system receptorów jest aktywowany przez szereg bodźców: mechanicznych, chemicznych, termicznych, a ponadto posiada zdolności regulacyjne w stosunku do przylegających tkanek. Receptory tego systemu oddziałują z układem autonomicznym. Ich odpowiedź może być początkowo nieaktywna i wzrastać w miarę upływu czasu działania bodźca zapalnego (15). Dla przykładu, bodźce termiczne wywołują pobudzenie zarówno włókien grupy A, jak i grupy C – silne bodźce termiczne, polegające na intensywnym ogrzewaniu (gdy bodziec

jest aplikowany powoli) aktywują w głównej mierze włókna typu C, podczas gdy intensywne oziębienie aktywuje zarówno włókna C jak i $A\delta$ oraz $A\beta$ (14,16).

Sytuacja taka może wynikać z aktywności systemu polimodalnego lub z obecności receptorów z grupy vanilloidowych. Wyróżniamy kilka typów tych receptorów: TRPV1 – TRPV6. W strukturze nerwów sensorycznych znajdują się jedynie receptory TRPV1 oraz TRPV2 (17), a receptor TRPV3 można odnaleźć na włóknach układu współczulnego (17). Receptor TRPV1 jest pobudzany za pośrednictwem kapsaicyny, ciepła ($>43^{\circ}\text{C}$ w warunkach normalnego pH, w przypadku pH kwaśnego temperatura aktywacji tego receptora jest niższa) oraz $\text{pH}<5,9$ (17,18). Zlokalizowany jest w głównej mierze na receptorach polimodalnych i włóknach typu $A\delta$. Jego zadaniem jest głównie przekazywanie bodźców związanych z wysoką temperaturą, ale może on uczestniczyć również w transmisji innych bodźców nocyceptywnych (18). TRPV2 jest receptorem związanym również z transmisją bodźców cieplnych, lecz do jego aktywacji dochodzi przy temperaturze przekraczającej 52°C . Dlatego uważa się, że receptor TRPV2 uczestniczy w odczuwaniu silnych bodźców cieplnych (gorąca) zaś TRPV1 w transmisji bodźców o średnim natężeniu (ciepła). Ponadto w obrębie miazgi zęba znajdują się receptory aktywowane w głównej mierze przez zimno – TRPA1. Receptory te należą również do receptorów z rodziny vanilloidowych i mogą one być odpowiedzialne za powstawanie nadwrażliwości miazgi na zimno w przypadku przewlekłych zmian zapalnych toczących się w obrębie zęba (19).

Podobne złożone zależności związane z pobudzeniem różnych typów włókien nerwowych przez ten sam bodziec działający w różnych warunkach obserwuje się w

przypadku bodźców hydrodynamicznych czy chemicznych (serotonina, histamina, bardykinina, kapsaicyna) – zostały one szczegółowo przedstawione w tabeli 2.

Szczegółowy opis wpływu włókien nerwowych na przebieg procesów patologicznych toczących się w obrębie miazgi i okolicy okołowierzchołkowej zębów przedstawiony jest poniżej.

Mechanopercepcja jest realizowana za pośrednictwem specjalnych receptorów ciałek Ruffiniego zlokalizowanych w ozębnej oraz za pośrednictwem włókien nerwowych typu A β miazgi.

Włókna te tworzą specyficzne mechanoreceptory miazgi. Podejrzewa się, że główną funkcją tych włókien jest właśnie przewodzenie czucia bodźców mechanicznych, w głównej mierze wibracji. Mechanoreceptory te różnią się od ciałek Ruffiniego pod wieloma względami: nie przekazują informacji o kierunku działania bodźca mechanicznego, posiadają charakterystyczną odpowiedź na wzrastającą siłę bodźca mechanicznego oraz ich czucie zostaje wyłączone po wykonaniu znieczulenia miazgi zęba (13).

Funkcja naczynioruchowa realizowana jest w głównej mierze za pośrednictwem autonomicznego sympatycznego układu nerwowego oraz według niektórych autorów w nieznacznym stopniu za pośrednictwem unerwienia parasympatycznego, którego obecność w obrębie miazgi zęba jest nadal kontrowersyjna.

Aktywacja włókien układu współczulnego prowadzi do uwolnienia norepinefryny, NPY oraz trójfosforanu adenozyiny jako głównych neurotransmiterów biorących udział w kontroli naczyń miazgi (20). Ponadto w regulacji miazgowego przepływu krwi uczestniczą też czynniki miejscowe. Aksony układu sympatycznego są mniej liczne niż włókna nerwowe układu czuciowego. Skurcz naczyń zaopatrujących miazgę zęba występujący na skutek aktywacji włókien układu sympatycznego zachodzi głównie za pośrednictwem α_1 -adrenoreceptorów, ale również mają w tym procesie udział α_2 -adrenoreceptory oraz neuropeptyd Y (21-23).

Mechanizm działania danego typu receptora zależy od jego lokalizacji: α_1 -adrenoreceptory zlokalizowane są postsynaptycznie, w przeciwieństwie do α_2 -adrenoreceptorów, które są rozmieszczone zarówno pre- jak i postsynaptycznie. Aktywacja presynaptycznych α_2 -adrenoreceptorów za pomocą noradrenaliny skutkuje zmniejszoną reakcją skurczową naczyń zależną od receptorów α_1 . Związane jest to z kontrolą zwrotną wydzielania noradrenaliny z zakończeń nerwowych układu sympatycznego. Jednocześnie postsynaptyczna aktywacja α_2 -adrenoreceptorów prowadzi do słabej reakcji naczynioskurczowej (10). Liczne badania nad kontrolą ukrwienia miazgi zębów wykazały również obecność β -adrenoreceptorów, lecz nie mają one znaczenia w nerwowej kontroli przepływu krwi w zakresie miazgi zębów. Fakt występowania reakcji naczynioskurczowej po zastosowaniu substancji blokujących α -adrenoreceptory może być wyjaśniony obecnością neuropeptydu Y - obecnego w niektórych włóknach nerwowych przebiegających wraz z włóknami zawierającymi β -hydroksylazę dopaminy (enzym odpowiedzialny za produkcję noradrenaliny). Wywołuje on skurcz naczyń krwionośnych miazgi niezależny od α -adrenoreceptorów, zwłaszcza w przypadku elektrycznej stymulacji o wysokiej częstotliwości włókien

adrenergicznych (21,24). Szczegółowe działanie poszczególnych neuropeptydów na naczynia miazgi zęba przedstawiono w Tabeli 2.

Rozkurcz naczyń krwionośnych miazgi zęba przebiegający za pośrednictwem układu parasympatycznego był mocno dyskutowany przez wielu autorów. Nadal nie ma jednoznacznego stanowiska w sprawie obecności włókien układu parasympatycznego w obrębie miazgi zęba.

Badania histochemiczne wykazały obecność aceholinoesterazy odpowiedzialnej za rozkład acetylocholinę w miazdze zębów ssaków (25,26). Miejscowe stosowanie acetylocholinę w obrębie miazgi zębów psa spowodowało znaczny wzrost przepływu krwi (27,28). Jednakże wystąpienie takiej reakcji nie jest jednoznacznym dowodem na istnienie unerwienia parasympatycznego i jego wpływu na krążenie krwi w zakresie miazgi zębów. Wykrycie transferazy acetylocholinowej – enzymu odpowiedzialnego za syntezę acetylocholinę byłoby już silniejszym dowodem. Jednakże badania takie nie zostały jeszcze przeprowadzone. W zakresie neuronów pozazwojowych wraz z acetylocholiną współistnieje inny mediator – VIP. Jego wydzielanie następuje w wyniku aktywności włókien przywspółczulnych. Tak, więc immunoreaktywność włókien nerwowych w zakresie VIP może być zastosowana jako marker obecności włókien parasympatycznych w miazdze zębów. Włókna takie zostały odnalezione w strukturze miazgi zębów wielu gatunków, w tym człowieka (29,30). Pomimo tego, jak już wspomniano powyżej, unerwienie parasympatyczne miazgi zębów nadal pozostaje sprawą kontrowersyjną.

Dodatkowo regulacja przepływu krwi w obrębie miazgi zęba może zachodzić wskutek oddziaływania nie-adrenergicznych, nie-cholinergicznym nerwów powodujących rozszerzenie naczyń krwionośnych (10).

Istnieje w miazdze zęba pewna populacja peptyderygicznych włókien nerwowych, należących do małej i średniej wielkości neuronów grupy C lub A δ . Włókna te są aktywowane głównie przez kapsaicynę. Zawierają one naczynioaktywne neurokininy, takie jak: substancja P, neurokinina A, CGRP (30). Wszystkie te substancje są odpowiedzialne za poszerzenie się miazgowych naczyń krwionośnych i zwiększenie przepływu krwi. Substancja P oraz CGRP są silnymi czynnikami naczyniorozkurczowymi, podczas gdy neurokinina A ma słabsze działanie (10).

Ten typ regulacji przepływu krwi w miazdze pozwala na poszerzenie naczyń krwionośnych i zwiększenie dopływu krwi w przypadku zaistnienia bodźca bólowego, przyłożenia do zęba przyrządu emitującego ultradźwięki czy ostukiwania zęba.

Ponadto silne, lecz krótkotrwałe obciążenie zęba doprowadza również do poszerzenia naczyń krwionośnych w opisywanym powyżej mechanizmie (31).

Tak więc bodźce, które wywołują ból na zasadzie hydrodynamicznego ruchu płynu wewnątrz kanalików zębinowych rozpoczynają nerwopochodne poszerzenie naczyń krwionośnych miazgi umożliwiając tym samym reakcję obronną zęba poprzez zwiększenie transportu substancji odżywczych i metabolitów.

Ponadto, jak wspomniano powyżej, włókna nerwowe odgrywają znaczącą rolę w przebiegu procesów patologicznych: modułują przebieg procesów zapalnych oraz przebudowę kości szczękowych w odpowiedzi na czynniki uszkodzające. Ponadto włókna układu sympatycznego mają zdolność modulowania przewodzenia sygnałów bólowych.

Homeostaza kości pozostaje pod kontrolą zarówno ośrodkowego jak i obwodowego systemu nerwowego. Kontrola ośrodkowego układu nerwowego nad homeostazą układu kostnego polega na odpowiednim wydzielaniu hormonów oraz regulacji sygnałów neuronalnych za pośrednictwem podwzgórza. Obwodowa regulacja neuronalna homeostazy kości przebiega za pośrednictwem szeregu substancji, takich jak: substancja P, CGRP, VIP, NPY, serotonina, noradrenalina. Wszystkie z tych substancji wpływają na procesy metaboliczne przebiegające w obrębie kości i są wydzielane za pośrednictwem włókien nerwowych (32).

Powszechnie znana jest funkcja ciałek Ruffiniego obecnych w obrębie ozębnej w utrzymaniu wysokości i objętości wyrostków zębodołowych szczęk i żuchwy na zasadzie mechanoceptywnej nerwowej odpowiedzi zwrotnej.

Po ekstrakcji zęba dochodzi do utraty średnio 13 000 aksonów w obrębie kości – dochodzi do praktycznie całkowitego zaniku włókien nerwowych dużej średnicy oraz do znacznego zmniejszenia się ilości włókien nerwowych małej średnicy. Jednocześnie usunięcie zęba doprowadza do znacznego zaniku wyrostka zębodołowego w tej okolicy. Istnieje hipoteza, że zanik ten spowodowany jest nie tylko brakiem pobudzeń

mechanicznych ze strony zęba i jego aparatu zawieszeniowego, lecz także znacznym zanikiem włókien nerwowych tej okolicy (32).

Kolejną właściwością włókien nerwowych zęba jest regulacja oraz modulacja doznań bólowych w przebiegu odpowiedzi na patologiczne czynniki uszkodzające miazgę oraz udział w patogenezie zapaleń neurogennych (włókna nerwowe układu sympatycznego) (3). Aktywacja włókien układu współczulnego doprowadza do obkurczenia naczyń miazgi i do przejściowego niedokrwienia w zakresie tej tkanki. Włókna nerwowe typu A gwałtownie tracą swoje właściwości do pobudzenia i przewodzenia bodźców w warunkach niedokrwienia miazgi, tak więc pobudzenie włókien układu sympatycznego doprowadza do chwilowego obniżenia dolegliwości bólowych (10).

Ponadto w odpowiedzi na uszkodzenie nerwów czuciowych unerwiających miazgę zęba dochodzi do zwiększenia się ilości autonomicznych włókien nerwowych oraz ich kontaktu z uszkodzonymi włóknami czuciowymi. Pozwala to na uaktywnienie tych włókien czuciowych za pomocą pobudzenia α -adrenoreceptorów (3) przy współdziałaniu noradrenaliny. Jest to jeden z mechanizmów modulujących odczuwanie bólu w przebiegu procesów zapalnych.

Do wzrostu ilości autonomicznych włókien nerwowych dochodzi również w wyniku urazu zębiny. Jednakże wzrost ten dotyczy jedynie splotów odontoblastycznych i pododontoblastycznych – nie dochodzi do wnikania tych włókien do kanalików zębinowych. Tak, więc do współdziałania pomiędzy autonomicznymi oraz czuciowymi włóknami nerwowymi nie dochodzi w obrębie kanalików zębinowych.

Rola procesu doprowadzającego do zwiększenia się ilości tych włókien nie jest jasna – podejrzewa się, że stymulują one odontoblasty do wytwarzania matrix, która następnie staje się podstawą do budowy zębiny obronnej.

Zmiany morfologiczne w obrębie włókien unerwiających miazgę oraz ich połączeń w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek oraz ich zapalenie mogłyby wyjaśniać pochodzenie silnych dolegliwości bólowych w przebiegu procesów patologicznych zębów.

Klinicznie wiadomo, że procesy zapalne miazgi zęba mogą przebiegać z bardzo silnymi, samoistnymi lub wywoływanymi bodźcami termicznymi dolegliwościami bólowymi. Wskazuje to na zwiększenie się czułości nocycceptorów zlokalizowanych w obrębie miazgi. Ponadto dochodzi również do zmian strukturalnych na poziomie OUN wywołujących silniejsze dolegliwości bólowe (33,34).

Z drugiej zaś strony znane są kliniczne przypadki martwicy miazgi przebiegające bez jakichkolwiek dolegliwości bólowych. Fakt ten wskazuje na istnienie obwodowych i centralnych mechanizmów kontrolujących wrażliwość nocycceptorów w zębach oraz drogi przekazywania bodźców bólowych za pośrednictwem gałęzi nerwu trójdzielnego. Może to też wynikać z sytuacji, w której ważniejszą rolę będzie pełniła eferentna funkcja nerwów czuciowych miazgi w modulacji procesów zapalnych niż ich funkcja aferentna polegająca na transmisji bodźców bólowych.

Udowodniono również, że w wyniku relatywnie długiego okresu aktywności włókien sympatycznych (np. w sytuacji przewlekłego stresu) dochodzi do obniżenia się

wrażliwości włókien typu A na skutek skurczu naczyń krwionośnych i przewlekłego niedokrwienia miazgi.

Dodatkowo w trakcie przebiegu reakcji zapalnej może dochodzić do aktywacji peptydergicznych włókien nerwowych za pośrednictwem mediatorów tej reakcji uwalnianych w miazdze. W ten sposób dochodzi do wydzielania substancji powodujących poszerzenie naczyń krwionośnych i do modulacji przepływu krwi w stanach zapalnych miazgi za pośrednictwem włókien czuciowych (10). Jest to bardzo ciekawe zjawisko w aspekcie współistniejącego procesu zwiększania się ilości czuciowych włókien nerwowych oraz regulacji zwrotnej neuropeptydów w przebiegu ostrej fazy zapalenia miazgi – co sugeruje znaczny udział aferentnych włókien nerwowych w przebiegu procesów zapalnych (10).

Poza głównymi funkcjami włókien nerwowych i wydzielanych przez nie mediatorów, które zostały przedstawione powyżej, zakończenia włókien nerwowych mogą uczestniczyć w regulacji przepływu płynów wewnątrz kanalików zębinowych, tworzeniu zębiny, mogą wpływać na funkcję komórek miazgi. Szczegółowe zestawienie funkcji włókien nerwowych i ich neuropeptydów zostało przedstawione w tabeli 3.

5. Charakterystyka znaczników biorących udział w przewodzeniu bodźców nerwowych

Intensywne badania dotyczące neuropeptydów rozpoczęto około 40 lat temu. Od tego czasu, każdego roku, nasza wiedza dotycząca tego zagadnienia powiększa się w

znaczącym tempie. Obecnie znamy szereg neuropeptydów występujących w organizmie ludzkim, a ich lista z pewnością nie jest jeszcze zamknięta.

Neuropeptydy to białkowe substancje pełniące rolę neurotransmiterów lub neuromodulatorów. Zwykle składają się one z łańcuchów polipeptydowych zbudowanych z 3 do 100 aminokwasów. Są to cząsteczki znacznie większe niż klasyczne neurotransmitery (np. acetylocholina), lecz stanowczo mniejsze i mniej skomplikowane w swojej strukturze trójwymiarowej niż większość substancji białkowych. Są one produkowane w obrębie komórek nerwowych i działają za pośrednictwem specyficznych receptorów znajdujących się w błonie komórkowej komórek docelowych (20).

Synteza neuropeptydów jest skomplikowanym procesem, znacznie różniącym się od tego, w wyniku którego powstają klasyczne neuroprzekaźniki (35). Wszystkie aktywne neuropeptydy stanowią część większej, nieaktywnej cząsteczki prekursorowej, przechowywanej w tak zwanych gęstych ziarnach wydzielniczych lub wewnątrz narządów wydzielniczych. Prekursory te przechowywane są wraz z enzymami – konwertazami - „odcinającymi” krótsze, aktywne neuropeptydy. Następnie dochodzi do istotnych posttranslacyjnych modyfikacji enzymatycznych peptydu, jak glikozylacja, przyłączenie grupy amidowej, acetylacja, fosforylacja czy sulfatacja (35). Modyfikacje te prowadzą do uzyskania biologicznie czynnego neuropeptydu. Ponadto prekursory neuropeptydów mogą zawierać w swojej strukturze kilka kopii tej samej cząsteczki lub kilka różnych typów cząsteczek (35).

W obrębie neuronów ekspresja neuropeptydów zachodzi zgodnie z trzema schematami: typ 1 – syntetyzowane są znaczne ilości substancji i przechowywane w obrębie neuronów (np. SP i CGRP w nerwach czuciowych, GAL w neuronach podwzgórza, VIP i NPY w neuronach kory mózgu), typ 2 – w warunkach fizjologicznych ilości tych neuropeptydów są śladowe lub niewykrywalne a ich synteza wzrasta w stanach patologicznych, jak np. uraz nerwu (np. VIP, GAL i NPY w nerwach czuciowych) oraz typ 3 – ekspresja cząsteczek zachodzi podczas ontogenezy i jest hamowana w trakcie życia osobniczego (np. SOM w obrębie CSN, GAL w neuronach czuciowych). Pomiędzy typem 2 a typem 3 wydaje się zachodzić współzależność polegająca na możliwości „reaktywacji” ekspresji neuropeptydów normalnie produkowanych w trakcie ontogenezy na skutek procesów patologicznych zachodzących podczas życia osobniczego (np. uraz nerwu) (35). Pojedynczy neuropeptyd może być zakwalifikowany do każdej z trzech grup w zależności od typu neuronu, w którym go rozpatrujemy (tabela 4).

Neuropeptydy nigdy nie występują w neuronach samodzielnie – zawsze w połączeniu z jednym lub wieloma klasycznymi neuroprzekaźnikami (np. adrenalina, noradrenalina, GABA, ATP) (35). Tak, więc substancje te mogą pełnić funkcję uzupełniającą w stosunku do tych neuroprzekaźników lub odgrywać w układzie nerwowym całkowicie odrębną rolę, jak np. wpływać na reakcje troficzne. Pomiędzy klasycznymi neuroprzekaźnikami a neuropeptydami istnieje różnica w sposobie ich syntezy i uzupełnienia po uwolnieniu z neuronu.

Klasyczne neuroprzekaźniki często podlegają mechanizmowi wychwytu zwrotnego za pomocą specjalnych transporterów, co pozwala na ich szybkie ponowne

użycie. Substancje te mogą być syntetyzowane w obrębie zakończeń nerwowych. Synteza neuropeptydów zachodzi tylko i wyłącznie w obrębie rybosomów zlokalizowanych w ciele komórki a ich uzupełnienie w zakończeniach nerwowych po uwolnieniu zachodzi na drodze transportu aksonalnego z miejsca syntezy do zakończeń nerwowych (35).

Istnieje coraz więcej dowodów na działanie troficzne neuropeptydów oraz na ich dużą rolę w trakcie rozwoju embrionalnego (35). Niektóre z tych substancji – jak np. somatostatyna – występują w danych narządach tylko w okresie embrionalnym a potem zanikają. Gressens i wsp. wykazali również ogromny wpływ VIP na wzrost zarodków *in vitro*, który może być wynikiem skrócenia faz G1 i S cyklu komórek nerwowych. De Felipe i wsp. udowodnili zaangażowanie substancji P i receptorów NK1 w trakcie embriogenezy rdzenia kręgowego (35).

Rola neuropeptydów w organizmie człowieka jest rozległa stąd niemożliwe jest sklasyfikowanie i opisanie wszystkich efektów wywoływanych działaniem poszczególnych neuropeptydów. Wiedza na temat tych substancji i ich efektów działania ciągle pozostaje niezgłębiona. Z pewnością odgrywają one ogromną rolę w mechanizmach powstawania i przewodzenia bólu. Potwierdza to fakt, że morfina – która jest jedną z najefektywniejszych substancji przeciwbólowych – działa właśnie za pomocą opioidowych receptorów peptydowych. Niektórzy badacze wskazują na rolę antagonistów receptora dla substancji P w leczeniu ostrego bólu pooperacyjnego. Rozpatruje się również udział neuropeptydów lub ich antagonistów w leczeniu alkoholizmu, agresji, depresji (35). Neuropeptydy takie mogą pełnić rolę

neurotransmitterów, czynników wzrostu, hormonów oraz molekuł przekaźnikowych systemu immunologicznego (20).

W obrębie miazgi zęba znajduje się szereg neuropeptydów z których wiodącą rolę mają: substancja P, CGRP, neurokinina A, neuropeptyd Y oraz VIP.

6. Charakterystyka procesów zapalnych okolicy okołowierzchołkowej zęba

Proces zapalny okolicy okołowierzchołkowej zęba jest następstwem infekcji bakteryjnej, przebiegającej najczęściej wewnątrz zakażonej miazgi kanałowej zęba oraz działania toksyn bakteryjnych przenikających na rejon okołowierzchołkowy.

Bakterie uszkadzają organizm gospodarza w sposób bezpośredni oraz pośredni. Bezpośrednie oddziaływanie szkodliwe drobnoustrojów polega na uszkodzeniu komórek lub macierzy międzykomórkowej tkanki łącznej poprzez aktywowanie enzymów, egzotoksyn i szkodliwych produktów bakteryjnych przemian metabolicznych. Oddziaływanie pośrednie polega na wydzielaniu szeregu substancji, np. proteoglikanów, białek błony komórkowej, DNA, które aktywują komórki układu immunologicznego do produkcji poszczególnych cytokin doprowadzających do wystąpienia reakcji zapalnej i uszkodzenia struktury kości.

Wstępną odpowiedzią tkanek ozębnej na infekcję jest przekrwienie: początkowo czynne - tętnicze, a następnie bierne - żylnie. Jeżeli czynnik drażniący nie zostanie usunięty, dochodzi do niespecyficznego oraz specyficznego zapalenia (zarówno komórkowego jak i humoralnego). Obserwuje się poszerzenie naczyń krwionośnych, uszkodzenie śródbłonna oraz zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych.

W tym samym czasie przebiega również lokalna prezentacja antygenów, co doprowadza do migracji i aktywacji komórek - limfocytów odpowiedzialnych za swoistą odpowiedź immunologiczną (m. in. produkcję przeciwciał oraz cytokin) (36).

Miazga zęba jest tkanką bogato unaczynioną, która jednocześnie znajduje się w twardej obudowie zębiny i szkliwa. W związku z tym faktem w przebiegu procesów zapalnych dochodzi do znacznego zwiększenia się ciśnienia tkankowego na skutek wzmożonego wypływu płynu z kapilar naczyńiowych.

Aby zapobiec uszkodzeniu tkanki w zębie musi funkcjonować wydolny i skuteczny system naczyń limfatycznych. Naczynia te są znacznie gęściej zlokalizowane w przywierzchołkowej 1/3 części miazgi korzeniowej niż w obrębie miazgi koronowej, a w zębach trzonowych sieć limfatyczna w obrębie miazgi koronowej jest znacznie gęstsza niż odpowiednia sieć limfatyczna zębów siecznych (37). Naczynia limfatyczne nie penetrują w głąb warstwy odontoblastów. W okolicy otworu wierzchołkowego przebiegają one równolegle do długiej osi kanału zęba i wszystkie zmierzają do tego otworu, przez który wychodzą poza obręb tkanek zęba. Naczynia limfatyczne opuszczają struktury zęba również przez boczne kanaliki w korzeniu zęba i w okolicy furkacji zębów trzonowych. Jest to zakres dróg komunikacji pomiędzy miazgą a ozębną w zakresie naczyń limfatycznych (37). Zadaniem naczyń limfatycznych w przebiegu zapalenia miazgi zęba jest transport płynów oraz przefiltrowanych substancji białkowych, ponieważ substancje te nie mogą być ponownie wchłonięte do naczyń krwionośnych. Zmiany zapalne w miazdze mogą ulec odwróceniu tylko w sytuacji, gdy po opanowaniu czynnika zapalnego przez układ immunologiczny, układ limfatyczny

jest w stanie zapewnić prawidłowy poziom białek i płynów – a przez to prawidłowe ciśnienie tkankowe. Jeżeli jeden z tych mechanizmów zawiedzie – nie uda się opanować czynnika zapalnego lub nie uda się przywrócić prawidłowego ciśnienia tkankowego dochodzi do obumarcia miazgi i do kolonizacji przez bakterie.

W wyniku patologicznego oddziaływania bakterii z kanału korzeniowego zęba oraz ich toksyn na okolicę wierzchołkową zęba dochodzi do wytworzenia się dwóch zasadniczych typów zmian okołowierzchołkowych: ziarniniaków zapalnych oraz torbieli korzeniowych. Reprezentują one dwa różne stadia rozwojowe tego samego procesu zapalnego wywoływanego przez niespecyficzną, wielobakteryjną infekcję.

Ziarniniak okołowierzchołkowy jest histologicznie definiowany jako tkanka ziarninowa powstała na skutek zapalenia przewlekłego, zawierająca w swoim składzie również nabłonkowe komórki wysp Malasseza.

W obrębie niektórych ziarniniaków dochodzi do proliferacji komórek Malasseza i wytworzenia się zapalnych torbieli okołowierzchołkowych (korzeniowych). Torbiele te są najczęściej występującymi torbielami kości szczękowych (38). Początkowe stadium rozwojowe torbieli korzeniowej – torbiel „zatoczkowa” lub „kieszeniowa” (bay lub pocket cysts) komunikuje się z kanałem korzeniowym zęba. Forma dojrzała torbieli korzeniowej nie posiada takiej łączności (39), jest całkowicie wewnątrz wysłana komórkami nabłonka (40).

Ziarniniaki okołowierzchołkowe zawierają w swoim składzie komórki bakterii w przeciwieństwie do torbieli korzeniowych, które ich nie zawierają, jednakże jak już

wspomniano powyżej obecność bakterii oraz ich toksyn jest konieczna do rozwoju tego typu zmian zapalnych (39).

W odpowiedzi zapalnej okolicy wierzchołkowej zęba uczestniczy wiele populacji komórek, jak: limfocyty (subpopulacji T oraz B), komórki plazmatyczne, makrofagi, granulocyty, mastocyty, eozynofile, komórki dendrytyczne. Wśród komórek tych znaczącą przewagę ilościową mają limfocyty zarówno populacji T- jak i B- (40,41), następną grupę pod względem liczby komórek stanowią granulocyty, kolejno wyliczyć należy makrofagi, komórki dendrytyczne oraz mastocyty (40). Limfocyty T stanowią najliczniejszą populację komórkową w obrębie zapalnych zmian okołowierzchołkowych, a limfocyty Th odgrywają znaczącą rolę w tym procesie (39) - Th1 odpowiadają za progresję stanu zapalnego i zniszczenie kości a komórki Th2 za procesy gojenia i ograniczania się stanu zapalnego (40).

Na skład komórkowy mają wpływ takie czynniki jak typ odpowiedzi immunologicznej (specyficzna/niespecyficzna), czas trwania procesu zapalnego, stopień uszkodzenia kości, ogólna odporność gospodarza oraz występowanie lub brak objawów klinicznych.

Badania cytometryczne wykazały, iż zmiany okołowierzchołkowe przebiegające z dolegliwościami klinicznymi wykazywały większą ilość granulocytów niż zmiany przebiegające bez takich dolegliwości (40). Fakt ten wskazuje na świeżą infekcję i zaostrzenie procesu zapalnego w zmianach wywołujących dolegliwości kliniczne. Ponadto stosunek limfocytów T/B w zakresie poszczególnych zmian okołowierzchołkowych jest niestały i podlega znacznym wahaniom.

W obrębie zmian okołowierzchołkowych znajdują się również mastocyty – komórki prozapalne odpowiedzialne za przebieg zapalenia przewlekłego poprzez zapoczątkowanie i wzmocnienie mechanizmów obronnych gospodarza w odpowiedzi na zakażenie bakteryjne. Komórki te produkują histaminę, serotoninę oraz inne naczynioaktywne aminy, TNF- α , tryptazę, metaloproteinazę-9, modulują proliferację limfocytów T CD8⁺ oraz produkcję ich cytokin – funkcja ta jest realizowana bezpośrednio poprzez produkcję chemokin takich jak limfoaktyna, interleukina 16 (IL-16) czy MIP-1 β lub pośrednio poprzez indukcję ekspresji molekuł adhezyjnych na komórkach endothelium, ponadto mastocyty prezentują antygeny komórkom T. Badania wykazały, iż większą liczbę mastocytów można znaleźć w obrębie torbieli okołowierzchołkowych niż w ziarniniakach tej okolicy. Komórki te odnaleźć można w obszarach aktywnego procesu zapalnego, w obszarach obwodowych zmian zapalnych, wokół nerwów oraz pośród leukocytów, komórek piankowatych i fibroblastów. W torbielach okołowierzchołkowych komórki te zlokalizowane również bywają pod wyściółką nabłonkową. Mastocyty znajdują się w bezpośrednim kontakcie z komórkami limfocytopodobnymi oraz w bliskim kontakcie z limfocytami, co sugeruje współpracę komórek T i mastocytów w przebiegu procesów zapalnych. Mastocyty są zdolne do wydzielania cytokin typu komórek Th1 lub Th2, przez co wpływają na różnicowanie się komórek T w poszczególne typy (42).

Komórki Langerhansa pochodzące ze szpiku kostnego to komórki prezentujące antygen limfocytom T. Ponadto komórki te wspomagają różnicowanie się limfocytów B w komórki plazmatyczne.

Komórki Langerhansa można odnaleźć w przebiegu chorób dermatologicznych, onkologicznych, wirusowych, chorób jamy ustnej (leukoplakia, zapalenie błony śluzowej jamy ustnej, zapalenie kątów warg) oraz w obrębie torbieli okołowierzchołkowych, gdzie zlokalizowane są w warstwie podstawnej oraz poniżej nabłonka wyścielającego jamę tych torbieli (43).

Wszystkie struktury znajdujące się w okolicy okołowierzchołkowej mogą zostać włączone w przebieg procesów zapalnych. Zmiany te mogą szerzyć się zarówno z miazgi zęba do tkanek okołowierzchołkowych, jak i w kierunku przeciwnym (np. z okolicy przyzębia brzeżnego sięgając do wierzchołka zęba).

Procesy patologiczne przebiegające w okolicy przyszczytowej zębów nie pozostają również bez wpływu na ich tkanki twarde i miazgę, jak również na znajdującą się w tym miejscu tkankę kostną.

W przebiegu tych procesów dochodzi do wydzielania szeregu mediatorów, w tym cytokin, które odgrywają kluczową rolę w przebiegu procesów zapalnych. Do grupy tych substancji należą między innymi: interleukina 1 (IL-1) odpowiedzialna w głównej mierze za resorpcję tkanki kostnej; interleukina 2 (IL-2) – silna substancja stymulująca odpowiedź immunologiczną produkowana głównie przez limfocyty T-pomocnicze (Th) oraz odpowiedzialna za ich klonalną ekspansję; interleukina 4 (IL-4) – hamująca funkcję makrofagów a pobudzająca monocyty i limfocyty B; interleukina 10 (IL-10) – hamująca procesy destrukcji kości; interferon gamma (IFN- γ) – aktywujący makrofagi oraz hamujący tworzenie się osteoblastów; TNF- α – cytokina prozapalna indukująca stymulację komórek wywołujących resorpcję kości, wzrost lokalnej

odpowiedzi naczyniowej oraz wspomaga przewlekły proces zapalny; aktywator ligandu receptora NF-kB (RANKL) oraz wiele innych. W wyniku działania tych substancji dochodzi również do zmian stopnia zmineralizowania tkanek twardych zęba tej okolicy, co wpływa na zmianę morfologii korzenia zęba w okolicy okołowierzchołkowej. Poszczególne typy komórek zapalnych odpowiedzialne są za wydzielanie poszczególnych cytokin. Komórki Th1 związane są z wydzielaniem interferonu- γ (IFN- γ), interleukiny-2 (IL-2) oraz TNF- α ; podczas gdy komórki Th2 wydzielają IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 oraz IL-13 (40).

Doniesienia naukowe wskazują, iż włókna nerwowe znajdujące się w okolicy wierzchołkowej zęba ulegają zmianom morfologicznym oraz neurochemicznym w przebiegu procesów zapalnych tej okolicy (44-49). W wyniku urazu miazgi dochodzi do proliferacji włókien nerwowych (zawierających CGRP, VIP, periferynę, białko S100B, niespecyficzną enolazę i chromograninę A) oraz zmiany ich rozmieszczenia - włókna formują gęste sieci okalające miejsce procesu zapalnego lub są zlokalizowane pomiędzy martwą a żywą tkanką (6,47,50). W przebiegu tych procesów dochodzi również do zwiększenia się immunoreaktywności w stosunku do substancji P oraz CGRP (51). Ponadto Rodd oraz Boissonade donoszą, iż w przebiegu zapaleń miazgi dochodzi do zwiększenia ekspresji substancji P (47).

7. Charakterystyka markerów reakcji zapalnej

Do oznaczenia poszczególnych typów komórek zapalnych zastosowano następujące markery immunohistochemiczne:

- a. **CD3** – białko składające się z pięciu łańcuchów polipetydowych o wadze molekularnej od 5 do 28 kD. Obecny na tymocytach oraz wszystkich subpopulacjach limfocytów T,
- b. **CD8** – białko składające się z dwóch łańcuchów polipetydowych o łącznej wadze 32kD. Uwidacznia limfocyty T cytotoksyczne oraz supresorowe, które stanowią około 25-35% limfocytów u ludzi. Ponadto znajduje się na komórkach NK, 80% tymocytów, 30% subpopulacji komórek null oraz 15-30% komórek szpiku kostnego,
- c. **CD20** – to nieglikolizowana fosfoproteina o wadze molekularnej 33 kD. Identyfikuje limfocyty B, jest uważany za receptor aktywujący te limfocyty oraz ich różnicowanie,
- d. **HLA/DR** – antygen MHC klasy II, posiadający swoje lokum na chromosomie 6. Jest heterodimerem składającym się z dwóch niekowalentnie połączonych glikoprotein o masie odpowiednio 35 i 27 kD. Obecny na komórkach prezentujących antygen (monocyty, makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki Langerhansa) i limfocytach B oraz niektórych aktywowanych limfocytach T,
- e. **CD68** – jest glikoproteiną wewnątrzkomórkową o masie 110 kD początkowo powiązaną z ziarnistościami cytoplazmatycznymi. Jest markerem uwidaczniającym makrofagi, jednakże znajduje się również na monocytach, bazofilach, neutrofilach i dużych limfocytach. Funkcja białka CD68 jest niejasna, lecz może zabezpieczać błony przed działaniem kwaśnych hydrolaz. Ponadto ekspresję białka CD68 wykazano w aktywowanych komórkach T i NK,

- f. **CD11c** – jest składnikiem rodziny adhezyjnych białek, integryn leukocytarnych. Odpowiedzialny za mediację reakcji komórka-komórka podczas reakcji zapalnych. Obecny na neutrofilach, makrofagach, monocytach, granulocytach, komórkach NK oraz limfocytach T. Jest odpowiedzialny w szczególności za adhezję monocytów i neutrofilów do pobudzonych komórek endotelium oraz za chemotaksję i fagocytozę cząstek pokrytych dopełniaczem.
- g. **Mieloperoksydaza (MPO)** – enzym należący do peroksydaz, występuje w ziarnistościach granulocytów obojętnochłonnych i jest uwalniana w reakcjach zapalnych. Jest białkowym tetramerem o masie cząsteczkowej 140 kDa.

8. Charakterystyka markerów włókien nerwowych

Do oceny włókien nerwowych w przebiegu zębopochodnych procesów zapalnych okolicy okołowierzchołkowej zastosowano markery przeciwko poszczególnym typom włókien nerwowych:

- a. **calcitonin gene-related peptide (CGRP) oraz substancja P (SP)** - neuropeptydy charakterystyczne dla włókien czuciowych pochodzących z pierwotnych neuronów czuciowych zwojów trójdzielnych. SP jest pierwszym wykrytym neuropeptydem w obrębie miazgi zęba (20). Jest to 11-to aminokwasowe białko, należy do rodziny tachykinin. SP po uwolnieniu z włókien nerwowych wywołuje rozszerzenie naczyń krwionośnych, degranulację mastocytów oraz skurcz mięśni gładkich (52). SP jest wydzielana zarówno przez włókna nerwowe, jak i przez

makrofagi, eozynofile, limfocyty i komórki dendrytyczne. Jej wydzielanie z włókien nerwowych następuje pod wpływem różnych typów bodźców uszkodzających (m.in. termiczne, mechaniczne, chemiczne, stymulacja elektryczna włókien typu C czy aplikacja kapsaicyny) (20). Podwyższone stężenia SP występują w przebiegu zapalenia miazgi (53,54) jak również w dolegliwościach bólowych oraz w progresji próchnicy (44,55). W przebiegu procesów zapalnych miazgi SP stymuluje fibroblasty do produkcji cytokin prozapalnych (52). Substancja P wywiera swoje działanie poprzez receptory błonowe – głównie NK. Wyróżnia się trzy typy receptorów z grupy NK: NK-1, NK-2, NK-3; z których NK-1 posiada największe powinowactwo do SP. CGRP jest 37-mio aminokwasowym białkiem, które oddziałuje na tkanki za pomocą dwóch typów receptorów: CGRP1 oraz CGRP2. Nerwy czuciowe przekazujące bodźce za pomocą substancji z rodziny tachykinin oraz CGRP w dużym stopniu zaopatrują tkanki jamy ustnej (56). Włókna zawierające te substancje w niewielkim stopniu towarzyszą naczyniom miazgi a w przeważającej większości przebiegają samodzielnie (51). CGRP znajduje się głównie w obrębie włókien wolnoprzewodzących (typu C oraz A δ), a tylko około 10-15% włókien zawierających CGRP wykazuje szybsze prędkości przewodzenia bodźców (A α oraz A β) (20). CGRP oraz SP w obrębie zęba odpowiadają za wzrost ukrwienia miazgi zęba, śródmiąższowy wzrost ciśnienia tkankowego, za regulację lokalnych procesów zapalnych, aktywację komórek układu immunologicznego oraz za pobudzanie komórek do proliferacji (56). Stwierdzono również sekrecję CGRP przez neurony

nocyceptywne (16). CGRP poza tkankami zęba może powodować inhibicję formowania się osteoklastów, promować tworzenie się osteoblastów, wspomagać wytwarzanie się kolagenu i formowanie kości (32). Stwierdzono koegzystencję CGRP oraz SP w odpowiednich włóknach nerwowych – co warunkuje jednoczesowe uwalnianie obu tych substancji pod wpływem tych samych bodźców (5,20).

b. neuropeptyd Y (NPY) – to 36-cio aminokwasowe białko mające podobną budowę do peptydów wydzielniczych jelit, trzustki, i peptydu YY. Jest szeroko rozpowszechnione zarówno w centralnym jak i obwodowym systemie nerwowym (57). W układzie współczulnym neuropeptyd Y jest przechowywany wraz z noradrenaliną i wraz z nią uwalniany podczas pobudzenia. Jest kotransmiterem obecnym w adrenergicznych włóknach układu współczulnego, często współlistnieje z hydroksylazą tyrozyny oraz DBH – markerami neuronów adrenergicznych (5,20,57). Włókna zawierające ten neuropeptyd okalają naczynia krwionośne tworząc charakterystyczne gęste sieci (20,57). Neuropeptyd Y jest silniejszą substancją obkurczającą naczynia krwionośne niż noradrenalina, działa dłużej i jest odporny na działanie antagonistów receptora α -adrenergicznego (57). Białko to działa za pośrednictwem kilku klas receptorów, z których sześć typów udało się sklonować (57). Włókna zawierające neuropeptyd Y w obrębie miazgi zęba najczęściej towarzyszą drobnym naczyniom krwionośnym, lecz spotyka się również włókna przebiegające bez kontaktu z naczyniami. Nie spotyka się tych włókien w obrębie splotu pododontobalstycznego. NPY w organizmie jest uwalniany w przypadku stresu, ćwiczeń

fizycznych oraz w sytuacjach zagrażających życiu. W miazdze zęba jest wydzielany pod wpływem stymulacji bodźcami elektrycznymi, termicznymi, mechanicznymi oraz w przebiegu próchnicy (20). Ponadto podejrzewa się pewien udział włókien zawierających neuropeptyd Y w transmisji bodźców nocycyptywnych (57).

- c. **β -hydroksylaza dopaminy (DBH)** – enzym z rodziny oksydoreduktaz uczestniczący w przemianie dopaminy do noradrenaliny. Obecny w synaptycznych pęcherzykach pozazwojowych neuronów układu sympatycznego. Jest znacznikiem włókien adrenergicznych,
- d. **wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP)** – to peptyd składający się z 28 aminokwasów, kotransmitter włókien głównie układu przywspółczulnego (20). Posiada aktywność naczyniorozkurczową działając w obszarze CSN, układu naczyniowego, immunologicznego oraz adrenergicznego. W zakresie systemu immunologicznego jest syntetyzowany przez mastocyty oraz limfocyty. Hamuje reakcje zapalne i zmienia ich przebieg na odpowiedź ze strony limfocytów Th2. W obrębie kości VIP łączy się z receptorami na osteoklastach i osteoblastach wpływając na proces resorpcji tkanki kostnej, a także hamuje osteoklastogenezę indukowaną przez aktywny metabolit witaminy D3 ($1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$) (32). Obecność włókien przywspółczulnych w zakresie miazgi zęba jest sprawą kontrowersyjną – pomimo to VIP udało się wykazać w obrębie tej tkanki jako włókna przebiegające w kontakcie z dużymi oraz drobnymi naczyniami krwionośnymi (20,58). Ponadto wykryto obecność VIP w zmianach okołowierzchołkowych (20,59). Nie ustalono jeszcze

dokładnych czynników wywołujących uwalnianie VIP z włókien przywspółczulnych – podejrzewa się NO jako jeden z czynników.

e. pęcherzykowy transporter acetylocholin (VACHT) – należy do rodziny aminowych transporterów pęcherzykowych, obecny w cholinergicznym włóknach autonomicznych. Jest odpowiedzialny za transport acetylocholin do wnętrza pęcherzyków wydzielniczych.

f. growth-associated protein 43 (GAP-43) – jest to białko związane ze wzrostem o m. cz. 43 kD zwane także B-50, F-1, pp46 lub neuromoduliną (60). Fosfoproteid ten zlokalizowany jest w wewnętrznej blaszce błony komórkowej aksonów, jest odpowiedzialny za wzrost aksonu (61) oraz wydzielanie neuromediatorów przez synapsy (62). Wysoką ekspresję tego białka stwierdzono we wzrastających aksonach podczas rozwoju płodowego i postnatalnego (63), a także w regenerujących włóknach nerwowych po ich uszkodzeniu (64).

U dojrzałych osobników GAP-43 był opisany w różnych częściach centralnego systemu nerwowego, gdzie odpowiada za procesy plastyczności i synaptogenezy (62,65). Przeciwciała skierowane przeciwko GAP-43 były wykorzystywane do immunohistochemicznego uwidocznienia wzrastających włókien nerwowych,

g. protein gene product 9.5 (PGP 9.5) – znacznik panneuronalny, białko obecne w perykarionach i wypustkach wszystkich populacji komórek nerwowych. Jest on białkiem enzymatycznym należącym do grupy hydrolaz ubikwitynowych (65,66) i występuje we wszystkich populacjach komórek nerwowych i w komórkach neuroendokrynowych

(67). PGP został także zastosowany do opisu rozwojowego unerwienia kości (68,69).

II. Cele pracy

Celem pracy jest:

1. Określenie typu histologicznego włókien nerwowych, jak również ich rozmieszczenia, w tkankach okołowierzchołkowych w zębach zdrowych oraz w trakcie ostrego i przewlekłego procesu zapalnego. Zaobserwowanie ewentualnego pojawiania się i wzrostu nowych włókien nerwowych w miejscu reakcji zapalnej.
2. Zbadanie w oparciu o SEM oraz mikroanalizę RTG składu pierwiastkowego tkanek twardych zęba zdrowego oraz zębów objętych procesem zapalnym. Poprzez porównanie dokonanie oceny zmiany stopnia mineralizacji tych tkanek oraz ewentualnych zmian morfologii zęba tej okolicy.
3. Stwierdzenie w obrazach SEM, w kanałach zębów obecności naczyń, komórek miazgi oraz stanu tych elementów.

III. Materiał

Materiał do badań stanowiły zęby pochodzące ze wszystkich grup (siekacze, kły, zęby przedtrzonowe oraz trzonowe) uzyskane od pacjentów zgłaszających się do Zakładu Chirurgii Stomatologicznej Instytutu Stomatologii UJ CM ze wskazaniem do ekstrakcji z przyczyn ortodontycznych oraz z powodu ostrych i przewlekłych stanów zapalnych okolicy okołowierzchołkowej. Badania przeprowadzono wyłącznie na uzębieniu stałym pacjentów o średniej wieku 33,91 lat, nie zgłaszających dolegliwości ogólnoustrojowych mogących wpływać na morfologię i skład pierwiastkowy ich uzębienia oraz aparatu zawieszeniowego.

Badania przeprowadzono w następujących grupach:

1. zębów usuniętych w przypadkach z typowymi objawami klinicznymi zapaleń okołowierzchołkowych zębów, potwierdzonych badaniem radiologicznym w przebiegu:
 - a) okołowierzchołkowych ostrych stanów zapalnych,
 - b) okołowierzchołkowych przewlekłych stanów zapalnych nie poddanych leczeniu endodontycznemu,
2. kontrolnej, którą stanowiły zęby usunięte ze wskazań ortodontycznych przy braku cech zapalenia w badaniu klinicznym i obrazie radiologicznym.

IV. Metody

1. Roztwory zastosowane w preparatyce

PF - buforowany paraformaldehyd: 4% roztwór paraformaldehydu w 0.1M buforze fosforanowym ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) o $\text{pH}=7.4$.

PBS (*phosphate buffered saline*): roztwór 0.9% soli fizjologicznej w 0.01M buforze fosforanowym o $\text{pH}=7.4$.

Roztwór odwapiający: mieszanina roztworów 5% kwasu solnego oraz 5% kwasu mrówkowego.

Roztwór do krioprotekcji: 30% sacharoza w buforze PBS, 0.01% azydek sodowy.

PAD (*primary antibody dilutor*, rozpuszczalnik przeciwciał): 5% nieimmunogenna (normalna) surowica kozia, 0.1% albumina surowicy wołowej, 0.05% thimerosal, 0.01% azydek sodowy (NaN_3), 1% Triton X-100.

2. Preparatyka histologiczna

Pobrane od pacjentów zęby z przeznaczeniem do wykonania przeglądowych barwień histologicznych lub do wykonania reakcji immunohistochemicznych przecinano w płaszczyźnie strzałkowej, a następnie utrwalano dobę w 4% zbuforowanym paraformaldehydzie. Zęby odwapiało w roztworze kwasów (3-7 dni), wypłukano w PBS i przepojono roztworem sacharozy. Zęby zostały zamrożone na płycie mrozeniowej kriostatu (-40°C), a następnie w osi strzałkowej cięto skrawki o grubości 16 μm . Skrawki montowano na szkiełkach pokrytych poli-L-lizyną i wysuszono.

3. Barwienia histologiczne

Na przygotowanych skrawkach wykonano następujące barwienia:

- a. przeglądowe (hematoksylina Meyera i eozyna),
- b. na obecność mastocytów (błękit toluidynowy),
- c. na proteoglikany macierzy (błękit alcjanowy),
- d. na włókna kolagenowe (trichrome w/g Massona-Goldnera).

4. Reakcje immunohistochemiczne

Część skrawków wykorzystano do wykonania pośrednich reakcji immunofluorescencyjnych z zastosowaniem przeciwciał dla markerów komórek reakcji zapalnej i odpowiedzi immunologicznej oraz znaczników neuronalnych. Wykonano tak pojedyncze barwienia z zastosowaniem tylko jednego z przeciwciał. Wyniki uzupełniono także podwójnymi reakcjami z zastosowaniem jednego ze znaczników zapalnych w połączeniu z markerem neuronalnym.

Uwodnione w PBS skrawki preinkubowano w roztworze PAD przez okres 40 min. w temperaturze pokojowej. Następnie inkubowano je w temperaturze pokojowej w komorach wilgotnych przez okres 17 godz. w roztworach pojedynczych przeciwciał pierwotnych (szczegółowa lista użytych przeciwciała w Tabeli 5) oraz w kombinacjach (PGP 9.5/ markery komórek reakcji zapalnych). Po wypłukaniu w PBS, nakładano na okres 2 godz. wtórne surowice: (1) kozią surowicę przeciw immunoglobulinom króliczym sprzężoną z fluorochromem Cy3 (Jackson IR, West Grove, USA, 111-165-144; rozc. 1:600), (2) kozią surowicę przeciw immunoglobulinom mysim sprzężoną z

fluorochromem Cy3 (Jackson IR, 115-165-146; rozc. 1:600), (3) kombinację koziej surowicy przeciw immunoglobulinom króliczym sprzężonej z fluorochromem Cy2 (Jackson IR, 111-225-144; rozc. 1:200) oraz koziej surowicy przeciw immunoglobulinom mysim sprzężonej z fluorochromem Cy3 (Jackson IR, 115-165-146; rozc. 1:600). Po ostatecznym wypłukaniu w PBS, skrawki zamknięto w środowisku Vectashield (Vector, Burlingame, USA, H-1000) minimalizującym efekt stopniowego spadku intensywności fluorescencji.

5. Obserwacja mikroskopowa i dokumentacja preparatów immunohistochemicznych

Preparaty z barwień histologicznych przeglądano w mikroskopie Olympus BX-50 w świetle przechodzącym. Preparaty immunofluorescencyjne oglądano w mikroskopie Olympus BX-50 z opcją epifluorescencji, wyposażonym w zestawy filtrów dla zielonej fluorescencji Cy2 (U-MNIBA) i czerwonej fluorescencji Cy3 (U-MNG). Obrazy rejestrowano przy użyciu cyfrowej kamery CCD Olympus DP-71 i opracowano z wykorzystaniem oprogramowania Olympus AnalySIS FIVE.

6. Badania w SEM oraz mikrosondzie RTG

Zęby, które zostały zakwalifikowane do oceny w skaningowym mikroskopie elektronowym po usunięciu utrwalono w 4% zbuforowanym paraformaldehydzie przez 3 godziny, a następnie materiał odplukano w wodzie destylowanej przez 5 godzin. Po otwarciu komór zębów zęby poddano kontrastowaniu 1% czterotlenkiem osmu buforowanym buforem fosforanowym do pH 7,4 i odwodniono preparaty we

wzrastających stężeniach alkoholu: 30%, 50%, 80%, 90% i 100%. Następnie umieszczono je w komorze próżniowej na 24 godziny, przyklejono do holdera klejem przewodzącym prąd elektryczny (zawierającym bardzo drobne opiłki srebra) i poddano naparowaniu cienką warstwą złota w spaterze.

Ocenę przygotowanych preparatów przeprowadzono w wytypowanych przypadkach w skaningowym mikroskopie elektronowym (typ JEOL-JSM-35CP).

Zdjęcia ze skaningowego mikroskopu elektronowego wykonano w Pracowni Mikroskopii Skaningowej Kliniki Laryngologii UJ CM w Krakowie kierowanej przez Prof. Adama Miodońskiego.

Ponadto w celu określenia składu pierwiastkowego badanych tkanek wybrane zęby poddano mikroanalizie RTG zarówno w przyszyjkowej jak i przyszczytowej części zęba (fot. 9). Naparowane w próżni węglem powierzchnie zębów poddano analizie w mikroanalizatorze rtg typu JEOL-JSM-5005-LU. W celu odczytu wyniku wykonywano analizę liniową z odczytem punktu. Otrzymane wartości procentowo-wagowe pierwiastków obliczono i uśredniono statystycznie według programu MAGIC IV.

V. Wyniki

W oparciu o przeprowadzone badania scharakteryzowano klinicznie badane przypadki, poddano analizie komórki prozapalne, włókna nerwowe oraz stopień zmian składu pierwiastkowego tkanek twardych okolicy okołowierzchołkowej zęba.

1. Charakterystyka kliniczna przypadków

Badania przeprowadzono na 66 zębach stałych usuniętych u 63 pacjentów o średniej wieku 33,91 lat. Badana grupa składała się z 32 (50,79%) kobiet oraz 31 (49,21%) mężczyzn. W badanej grupie w 17 przypadkach zęby usunięto z powodu silnych dolegliwości bólowych, w pozostałych przypadkach usunięte zęby nie wykazywały żadnych dolegliwości klinicznych. W 17 przypadkach (25,75%) usunięto zęby zdrowe ze wskazań ortodontycznych i te zęby stanowiły grupę kontrolną. W 5 przypadkach (7,58%) usunięto zęby z powodu toczącego się w okolicy okołowierzchołkowej stanu zapalnego o typie ostrym, a w 44 przypadkach (66,67%) o typie przewlekłym.

Badania radiologiczne w postaci przylegających zdjęć wewnątrzustnych lub przeglądowych zdjęć pantomograficznych były wykonywane w każdym przypadku. W 65 przypadkach rozpoznanie postawione na podstawie obrazu klinicznego oraz badań radiologicznych było zgodne z wynikami badań histologicznych. W 1 przypadku klinicznie postawiono rozpoznanie zapalenie przewlekłe, podczas gdy obraz histologiczny wskazywał na etap pośredni pomiędzy ostrym a przewlekłym charakterem procesu. Dotyczyło to pacjenta płci męskiej w wieku 22 lat, u którego

wstępnie postawiono rozpoznanie *periodontitis periapicalis chronica propter gangrenam pulpae dentis 37*. Jednakże badania w mikroskopie świetlnym i fluorescencyjnym wykazały brak komórek CD 20(+) przy jednoczesnej obecności neutrofilii MPO (+), co mogłoby wskazywać na toczący się proces o charakterze ostrym. W tym preparacie widoczne również były komórki CD68 (+), co wskazuje na istnienie zmian zapalnych o charakterze przewlekłym.

Zęby kontrolne usuwano na pisemne zlecenie lekarza ortodonta w trakcie leczenia ortodontycznego pacjentów, z powodu znacznego zaawansowania chorób przyzębia lub z powodu zatrzymania zębów w obrębie struktury kostnej i następowych dolegliwości z tym związanych (wskazania chirurgiczne do ekstrakcji zębów zatrzymanych). Zęby usuwane były w trybie planowym. Zęby z grupy kontrolnej pochodziły od pacjentów w wieku od 16 do 60 lat. W 1 przypadku (5,88%) był to dolny ząb sieczny, w 1 (5,88%) przypadku górny ząb sieczny, w 1 przypadku (5,88%) górny kieł, w 2 przypadkach (11,76%) dolne zęby przedtrzonowe, w 3 przypadkach (17,65%) górne zęby przedtrzonowe, w 5 przypadkach (29,41%) dolne trzecie zęby trzonowe a w 4 przypadkach (23,53%) górne trzecie zęby trzonowe. Wszystkie zęby z tej grupy, które nie pozostawały zatrzymane w kości usunięto na drodze ekstrakcji prostych, zęby zatrzymane w kości na drodze ekstrakcji chirurgicznych z wytworzeniem płata śluzówkowo-okostnowego.

W pięciu przypadkach zęby usunięto z powodu toczącego się w okolicy okołowierzchołkowej procesu zapalnego o typie ostrym. Zabieg ekstrakcji zębów w tej grupie wykonywany był ze wskazań nagłych, a pacjenci zgłaszali się do Zakładu Chirurgii Stomatologicznej z powodu silnych dolegliwości bólowych. Były to zęby z

następujących grup zębowych: przedtrzonowe szczęki w 1 przypadku, przedtrzonowe żuchwy w 1 przypadku, trzonowe szczęki w 2 przypadkach oraz trzonowy żuchwy w 1 przypadku. Przyczyną stanu zapalnego i następnych dolegliwości bólowych było zniszczenie koronowej części zęba z następującą infekcją miazgi. Zęby te usunięto na drodze ekstrakcji prostych w 4 przypadkach lub na drodze ekstrakcji chirurgicznych z wytworzeniem płata śluzówkowo-okostnowego w 1 przypadku. Ekstrakcja chirurgiczna była wykonana w zębie trzonowym szczęki z powodu znacznej destrukcji korony tego zęba.

Zębów usuniętych z powodu toczącego się w okolicy okołowierzchołkowej procesu zapalnego o typie przewlekłym było 44 (66,67%). Zabieg ekstrakcji zębów z tej grupy wykonywany był ze wskazań planowych, a pacjenci zgłaszali się do Zakładu Chirurgii Stomatologicznej z powodu znacznej destrukcji korony zęba lub z powodu przewlekłych zmian zapalnych okołowierzchołkowych wykrytych przypadkowo podczas badania radiologicznego. Były to zęby ze wszystkich grup zębowych: siekacze szczęki w 2 przypadkach (4,54%), kieł szczęki w 1 przypadku (2,27%), zęby przedtrzonowe szczęki w 5 przypadkach (11,36%), zęby trzonowe szczęki w 8 przypadkach (18,18%), siekacze żuchwy w 2 przypadkach (4,54%), przedtrzonowe żuchwy w 6 przypadkach (13,63%) oraz trzonowe żuchwy w 20 przypadkach (45,45%). Badania radiologiczne wykazywały przejaśnienie w okolicy okołowierzchołkowej zęba kwalifikowanego do ekstrakcji (Fot. 27). Zęby te usunięto na drodze ekstrakcji prostych w 26 przypadkach (59,09%) lub na drodze ekstrakcji chirurgicznych z wytworzeniem płata śluzówkowo-okostnowego w 18 przypadkach (40,91%). W 2 przypadkach po wykonaniu zabiegu ekstrakcji zęba materiał przesłano do badania histopatologicznego z

powodu obecności torebki łącznotkankowej wokół całej zmiany, co wskazywało na istnienie torbieli korzeniowej. Pacjenci Ci zostali wyłączeni z badań.

Do oceny składu pierwiastkowego tkanek zęba w mikrosondzie RTG oraz do oceny struktur zęba w mikroskopie elektronowym zakwalifikowano 15 zębów (23,81%). W tym 3 z grupy kontrolnej (zęby zdrowe), 4 z ostrym zapaleniem okołowierzchołkowym (26,67%) i 8 z przewlekłym zapaleniem okołowierzchołkowym (53,33%).

2. Ocena komórek prozapalnych

Reakcje immunohistochemiczne wykonane przy zastosowaniu przeciwciał dla markerów komórek reakcji zapalnej i odpowiedzi immunologicznej wykonano w następujących grupach:

- zęby bez cech zapalenia okołowierzchołkowego (grupa kontrolna)
- zęby z toczącym się okołowierzchołkowym procesem zapalnym o typie ostrym
- zęby z toczącym się okołowierzchołkowym procesem zapalnym o typie przewlekłym

Do uwidocznienia komórek zapalnych zastosowano przeciwciała skierowane przeciwko antygenom CD11c, HLA-DR, CD3, CD20, CD8, CD68, mieloperoksydazie (MPO).

W grupie kontrolnej przeprowadzone reakcje immunohistochemiczne na 17 zębach (119 preparatów) wykonane w kierunku obecności komórek zapalnych wykazały obecność pojedynczych komórek wykazujących immunoreaktywność na CD68, CD3, CD8, mieloperoksydazę (MPO).

W grupie zębów z toczącym się okołowierzchołkowym procesem zapalnym o typie ostrym wykazano pozytywne reakcje na następujące markery immunohistochemiczne: mieloperoksydaza (MPO) (Fot. 1) oraz CD 11c (Fot. 2). Badania w tej grupie dotyczyły zarówno miazgi znajdującej się w kanale zęba w bezpośrednim sąsiedztwie otworu wierzchołkowego jak i okolicy okołowierzchołkowej. Z ogólnej liczby 5 przebadanych zębów (35 preparatów) w 4 stwierdzono dodatnią reakcję uwidaczniającą komórki MPO (+) (11,43 %). W 5 wykazano komórki CD11c (+) (14,28 %). Ocena ilościowa wykazała przewagę liczebną komórek MPO (+) nad komórkami CD11c (+).

Barwienia immunohistochemiczne wskazują na zwiększoną ilość granulocytów (neutrofilii) w pierwszej, ostrej fazie procesu zapalnego w porównaniu z grupą kontrolną.

W 80% preparatów w barwieniach HE było widoczne nieznaczne uszkodzenie struktur twardych zęba oraz okolicy okołowierzchołkowej (Fot. 3). Tkanki miękkie tego regionu we wszystkich preparatach tej grupy zostały zachowane w całości lub uległy uszkodzeniu w różnym stopniu: od uszkodzenia częściowego do całkowitego rozpadu struktur tej okolicy (Fot. 3)

W grupie zębów z toczącym się okołowierzchołkowym procesem zapalnym o typie przewlekłym stwierdzono obecność komórek (Fot. 26) reagujących dodatnio na przeciwciała przeciwko CD3, CD20, CD8, CD68 oraz HLA-DR. Z ogólnej liczby 44 przebadanych zębów (308 preparatów) reakcję pozytywną na przeciwciała przeciwko CD3 wykazano w 195 (63,31%) przypadkach (Fot. 4); CD20 w 210 (68,18%) przypadkach (Fot. 5); CD8 w 185 (60,06%) przypadkach (Fot. 6); CD68 w 215 (69,80%) przypadkach (Fot. 7) oraz HLA-DR w 180 (58,44%) przypadkach (Fot. 8). Komórki CD8 (+) znajdowały się w znacznie większej liczbie w obrębie i w bezpośrednim sąsiedztwie łącznotkankowej torebki (na obwodzie zmian) a w niewielkiej w centrum zmiany (Fot. 9, 10). Komórki CD20 (+) zlokalizowane były głównie w obrębie nacieku zapalnego i praktycznie nieobecne w zakresie torebki łącznotkankowej (Fot. 11). Wyniki badań wskazują na zwiększoną ilość limfocytów – zarówno typu T jak i B oraz makrofagów w zmianach o typie przewlekłym. Wykazano przewagę liczebną limfocytów typu T nad limfocytami typu B. Liczba makrofagów w obrębie zmian zapalnych była zwiększona w porównaniu z grupą kontrolną. W przypadku niewielkich zmian okołowierzchołkowych makrofagi rozmieszczone były na obwodzie zmian zapalnych, podczas gdy w większych zmianach zapalnych komórki te były już widoczne w obrębie całej zmiany. Komórki HLA-DR (+) obserwowano w niewielkiej ilości zlokalizowane głównie na obwodzie (Fot. 8). Jednocześnie przeglądowe barwienia HE wykazały obecność torebki łącznotkankowej w 28 preparatach (9,09%) (Fot. 12). Torebka ta zwykle znajdowała się na obwodzie zmiany, była bogato unaczyniona i unerwiona (Fot. 6). Ponadto we wnętrzu zmiany obserwowano liczne zwłóknienia (Fot. 13).

Wykonywano również barwienia podwójne uwidaczniające zarówno poszczególne komórki zapalne jak i włókna nerwowe (Fot. 4, 6, 9, 10, 11, 22). Wyniki tych obrazów w zakresie komórek reakcji zapalnej są zgodne z wynikami uzyskanymi w barwieniach pojedynczych. Wzajemny stosunek włókien nerwowych do komórek zapalnych zostanie omówiony poniżej. (Fot. 4)

3. Ocena włókien nerwowych

Reakcje immunohistochemiczne wykonane przy zastosowaniu przeciwciał dla markerów włókien nerwowych wykonano w następujących grupach:

- zęby bez cech zapalenia okołowierzchołkowego (grupa kontrolna)
- zęby z toczącym się okołowierzchołkowym procesem zapalnym o typie ostrym
- zęby z toczącym się okołowierzchołkowym procesem zapalnym o typie przewlekłym

Do uwidocznienia włókien nerwowych zastosowano przeciwciała przeciwko PGP, CGRP, SP, NPY oraz VIP.

W grupie kontrolnej przebadano 17 zębów (85 preparatów). Uwidoczniono bogate unerwienie okolicy okołowierzchołkowej w postaci mieszaniny dużych i małych, rozgałęzionych pęczków włókien nerwowych zmierzających do otworu wierzchołkowego zęba uwidocznionych poprzez immunoreaktywność dla PGP 9.5 (Fot. 14, 15). Obrazy z wykonanych reakcji immunohistochemicznych uwidaczniających włókna PGP (+) pozwalają na zorientowanie się w przebiegu i ilości

wszystkich włókien nerwowych unerwiających miazgę zęba bez względu na ich typ. Wiele z włókien wykazujących immunoreaktywność w kierunku SP przebiegało w bliskości dużych bądź mniejszych naczyń krwionośnych, w przeważającej większości nie wykazując związku z tymi naczyniami (Fot. 16). Podobnie przebiegały włókna nerwowe CGRP-pozytywne (Fot. 17). Oba typy włókien osiągały otwór wierzchołkowy zęba i dalej wnikały w obręb miazgi (Fot. 24). Włókna SP/CGRP były mniej liczne niż włókna PGP-immunododatnie i wykazywały typową żyłakowatą morfologię. Wszystkie włókna nerwowe zawierające NPY przebiegały w kontakcie z naczyniami krwionośnymi oplatając je w charakterystyczny sposób (tworząc splot) (Fot. 18, 19, 25). Były one mniej liczne niż włókna grupy SP/CGRP. W badaniach w grupie kontrolnej nie wykazano włókien VIP w obrębie okolicy okołowierzchołkowej oraz miazgi zęba.

W grupie zębów z toczącym się okołowierzchołkowym procesem zapalnym o typie ostrym przebadano 5 zębów (25 preparatów). Barwienia w kierunku PGP (Fot. 20) wykazały zmianę rozmieszczenia przestrzennego i ilości włókien nerwowych okolicy okołowierzchołkowej zęba w odpowiedzi na ostry proces zapalny – doszło do zwiększenia się ilości włókien nerwowych, które zaczęły tworzyć gęstsze sieci. W tej grupie badania oceny rozmieszczenia włókien nerwowych dokonywano zarówno w obrębie miazgi kanału zęba w bezpośrednim sąsiedztwie otworu wierzchołkowego, jak i w tkankach okolicy okołowierzchołkowej. Podobne obrazy jak w barwieniu PGP (+) uzyskano w próbkach poddanych reakcjom immunohistochemicznym uwidaczniającym SP, CGRP oraz NPY – w wyniku toczącego się procesu zapalnego dochodziło do zwiększenia się ilości włókien nerwowych, które tworzyły coraz gęstsze sieci. Ocena półilościowa wykazała największy przyrost ilości włókien typu SP/CGRP (Fot. 21). Włókna NPY(+) wykazywały najmniej liczny przyrost ilościowy. Nie wykazano

obecności włókien VIP-immunoreaktywnych w okolicy okołowierzchołkowej zajętych ostrą reakcją zapalną.

W grupie zębów z toczącym się okołowierzchołkowym procesem zapalnym o typie przewlekłym przebadano 44 zęby (220 preparatów). Barwienia w kierunku włókien PGP (+) wykazały w 37 preparatach (84,10%) znaczny wzrost ilości włókien w stosunku do grupy zapalenia ostrego oraz grupy kontrolnej, w 4 preparatach (9,10%) wzrost ten był niewielki a w 3 preparatach (6,80%) ilość włókien była porównywalna z grupą zębów zapalenia ostrego i jednocześnie wyższa niż w grupie kontrolnej. Ocena półilościowa wykazała, podobnie jak w grupie zapalenia ostrego, największy przyrost ilości włókien SP (+)/CGRP (+). W grupie włókien CGRP zaobserwowano ze szczególnym nasileniem zależności obserwowane w przypadku barwienia w kierunku PGP. W 38 preparatach (86,40%) stwierdzono znaczny przyrost i zagęszczenie włókien nerwowych, w szczególności na obrzeżach zmian okołowierzchołkowych; w 3 preparatach (6,80%) wzrost ten był niewielki a w 3 preparatach (6,80 %) porównywalny z ilością włókien z grupy zapalenia ostrego i wyższy niż w grupie kontrolnej. We wszystkich próbkach NPY (+) doszło do zwiększenia się ilości włókien nerwowych, lecz przyrost ten nie był tak znaczny jak w przypadku grup SP (+)/CGRP (+). W przypadku zmian zapalnych (ziarniniaków oraz początkowych stadiów torbieli okołowierzchołkowej) dochodziło do zmiany lokalizacji wszystkich włókien nerwowych – włókna w dużej ilości i tworzące gęste sieci znajdowały się na obwodzie zmiany a we wnętrzu przeważały liczne komórki reakcji zapalnej. W tej grupie zmian nie uwidoczniiono włókien z grupy VIP.

Ponadto wykonywano barwienia podwójne uwidaczniające zarówno poszczególne komórki zapalne jak i włókna nerwowe. Wyniki tych obrazów są zgodne z wynikami uzyskanymi w barwieniach pojedynczych. W przypadku tworzenia się zmian zapalnych okolicy okołowierzchołkowej zęba dochodziło do zmiany rozmieszczenia włókien nerwowych, które przesuwały się na obwód i lokalizacji komórek zapalnych głównie w centrum zmiany. Na obrzeżach zmiany, gdzie dochodziło do rozrostu włókien nerwowych, które tworzyły sieci, obserwowano mniejszą ilość komórek zapalnych w porównaniu z centralną częścią.

4. Skład pierwiastkowy tkanek zęba

Zdjęcia wykonane ze skaningowego mikroskopu elektronowego uwidocznily zarówno strukturę zdrowych zębów (grupa kontrolna) (Fot. 24, 27, 30), jak i strukturę zębów w przebiegu zapaleń ostrych (Fot. 28, 29) oraz przewlekłych (Fot. 26, 31). W stanach zapalnych zachowana została, w pewnym zakresie, w miazdze zęba obecność odontoblastów z widocznymi wypustkami wchodzącymi w światło kanalików zębinowych. W zaawansowanych procesach zapalnych uwidoczniono komórki stanu zapalnego oraz pewną ilość (w zależności od nasilenia procesu zapalnego) zachowanych komórek miazgi zęba.

Skład pierwiastkowy określony za pomocą mikroanalizy RTG wykazał istotne zmiany zawartości tlenu, fluoru, sodu, fosforu, siarki, wapnia, strontu, żelaza i kadmu w przebiegu okołowierzchołkowych procesów zapalnych. Jednocześnie zawartość magnezu i potasu pozostała praktycznie na tym samym poziomie. Wartości średnie poziomu tlenu w twardych tkankach próbek z grupy kontrolnej wahają się od 19,676 do

24,250 wt% (uśredniona wartość 21,778 wt%), zakres zawartości tego pierwiastka zmienia się od 14,758 do 29,105 wt% (uśredniona wartość 20,174 wt%) w przebiegu ostrego zapalenia i obniża się nawet do wartości od 7,041 wt% do 25,968 wt% (uśredniona wartość 11,986 wt%) w zapaleniach przewlekłych. Podobną zależność obserwuje się w przypadku zawartości sodu i wapnia. Zawartość fluoru wynosząca 0,186-0,492 wt% (uśredniona wartość 0,293 wt%) w tkankach zdrowych wzrasta do 0,084-0,687 wt% (uśredniona wartość 0,379 wt%) w następstwie procesów zapalnych ostrych i sukcesywnie podwyższa się do wartości 0,041-1,000 wt% (wartość uśredniona 0,601 wt%) w grupie zapaleń przewlekłych. Podobnie ilość fosforu i kadmu wzrasta w wyniku toczących się w tkankach procesów zapalnych. Zawartość siarki utrzymująca się w strukturach zębów z grupy kontrolnej na poziomie 1,662-5,349 wt% (uśredniona wartość 3,580 wt%) początkowo obniża się w przebiegu zapalenia ostrego do wartości z zakresu 1,959-4,447 (wartość uśredniona 2,879 wt%) a następnie gwałtownie wzrasta w przebiegu zapaleń przewlekłych do wartości 1,469-13,164 wt% (wartość uśredniona 6,997 wt%). Podobnie zachowują się poziomy żelaza, cynku oraz strontu. Stosunek wapnia do fosforu (Ca/P) w grupie kontrolnej waha się w zakresie 1,096-1,528 wt% (wartość uśredniona 1,251 wt%), w grupie zębów z toczącym się ostrym procesem zapalnym wynosi 1,119-1,356 wt% (wartość uśredniona 1,269 wt%) a w grupie zębów z toczącym się przewlekłym procesem zapalnym wynosi 0,549-1,562 wt% (wartość uśredniona 1,707 wt%).

Szczegółowe wyniki dotyczące poszczególnych pomiarów zostały przedstawione w tabelach 7 do 17.

VI. Omówienie wyników i dyskusja

Przeprowadzone badania wykazały zależność pomiędzy toczącymi się procesami zapalnymi w okolicy okołowierzchołkowej zębów a morfologią włókien nerwowych i składem pierwiastkowym tkanek twardych zęba.

Wszystkie przebadane preparaty pochodziły z losowych i reprezentacyjnych obszarów. Wykazano obecność komórek zapalnych, które mogą uczestniczyć w opisanych zmianach ilościowych składu pierwiastkowego tkanek twardych zęba, jak również w modulacji ilości i rozmieszczenia poszczególnych włókien nerwowych tej okolicy.

Włókna nerwowe wykazano zarówno w próbkach z grupy kontrolnej, jak i z grupy zapalenia (zarówno ostrego jak i przewlekłego). Wykazano wzrost ilości i zmianę rozmieszczenia włókien nerwowych PGP (+), SP (+), CGRP (+) oraz NPY (+). Nie wykazano włókien układu przywspółczulnego badanych za pomocą VIP w żadnej z próbek grupy badanej i kontrolnej.

1. Ocena komórek prozapalnych

Przeprowadzone badania wykazały nieznaczną obecność komórek zapalnych w zębach bez cech zapalenia okołowierzchołkowego (grupa kontrolna) usuniętych ze wskazań ortodontycznych, co było zgodne z danymi z przeglądu piśmiennictwa (9,36,37,39,43,46,50). W przebiegu zapalenia ostrego doszło do wzrostu ilości zarówno

granulocytów, jak i makrofagów w zakresie miazgi zęba oraz okolicy okołowierzchołkowej. Badania prowadzono na zębach ludzkich usuniętych z powodu ostrych i przewlekłych stanów zapalnych okolicy okołowierzchołkowej. Ekstrakcje zębów zakwalifikowanych do tej grupy wykonywane były przy wyraźnych wskazaniach medycznych do usunięcia zębów oraz przy braku możliwości leczenia zachowawczego lub konieczności ekstrakcji ze względu na toczący się proces zapalny w okolicy okołowierzchołkowej. Ponadto praca na materiale ludzkim uniemożliwiała ocenę odległości czasowej od momentu rozpoczęcia się procesu zapalnego w obrębie miazgi zęba do czasu objęcia tym procesem okolicy okołowierzchołkowej. Niektóre z ocenianych próbek wykazywały brak lub nieznaczne zmiany zwyrodnieniowe miazgi zęba, co oceniano na podstawie preparatów barwionych przeglądowo hematoksyliną-eozyną, przy jednoczesnym zajęciu okolicy okołowierzchołkowej komórkami zapalnymi jedynie w zakresie tkanek otworu wierzchołkowego zęba. Inne z badanych zębów wykazywały już znacznie większe uszkodzenie miazgi i większą ilość komórek zapalnych w okolicy okołowierzchołkowej. Obserwacje te są zgodne z doniesieniami piśmiennictwa wskazującymi na szybkie (5 - 7 dni) rozprzestrzenianie się zmian zapalnych z obszaru miazgi zęba na okolicę przywierzchołkową (40,72).

Ocena ilości poszczególnych typów limfocytów wykazała przewagę limfocytów T nad limfocytami B w zakresie przewlekłych zmian zapalnych okolicy okołowierzchołkowej zęba. Jest to jedynie ocena półilościowa wykazująca w tym samym preparacie, na sąsiednich skrawkach większe zagęszczenie komórek typu T. Obserwacje te są zgodne z doniesieniami z literatury (40,73-81). Dane z literatury wskazują na przewagę limfocytów Th1 w obrębie zmian okołowierzchołkowych (36,40). Mechanizmy związane z działaniem limfocytów Th1 oraz wydzielanymi przez

nie cytokinami prowadzą w głównej mierze do rozprzestrzeniania się stanu zapalnego i destrukcji tkanki kostnej (40). Jest to zgodne z obserwacjami Jontell i wsp. według których ilość limfocytów typu T (w większości Th1) oraz B była większa w miazdze zębów z nieodwracalnym typem zapalenia niż w miazdze gdzie proces zapalny był odwracalny (82).

Ocena komórek prozapalnych wykazała wzrost ilości makrofagów i zmianę ich rozmieszczenia w zależności od wielkości zmiany. W zmianach zapalnych o większych rozmiarach obserwowano zwiększoną ilość makrofagów, które rozmieszczone były w obrębie całej zmiany; w tych o mniejszych rozmiarach liczba komórek była mniejsza a zlokalizowane były one głównie na obwodzie. Taka zależność i umiejscowienie tych komórek są zgodne z danymi dostępnymi w literaturze (83). W prowadzonych badaniach niemożliwa była ocena czasu od początku procesu zapalnego do powstania zmiany zapalnej w okolicy okołowierzchołkowej. Stąd dokładna ocena rozmieszczenia komórek zapalnych w aspekcie czasu toczącego się procesu zapalnego jest niemożliwa.

Skład komórkowy zmian okołowierzchołkowych jest zależny od wielu czynników, takich jak: stopnia rozwoju zmiany zapalnej, charakterystyki histologicznej zmiany, obecności lub braku objawów klinicznych oraz od metod zastosowanych do oceny komórek prozapalnych. Stwierdzona przewaga limfocytów T nad limfocytami B może wskazywać, że większość zmian zapalnych uwzględnionych w badaniach znajdowała się jeszcze w stanie rozwoju a nie w stanie gojenia.

Reasumując w badaniach wykazano, że w przypadku zmian zapalnych okolicy okołowierzchołkowej miazgi dochodzi do wzrostu komórek prozapalnych, w skład których wchodzi w głównej mierze limfocyty T oraz B, jak również makrofagi.

Wskazuje to na współistnienie w obrębie zmian okołowierzchołkowych odpowiedzi immunologicznej zarówno typu komórkowego jak i humoralnego. Ponadto w miarę rozwoju zmian zapalnych dochodzi do wzrostu ilości i zmiany rozmieszczenia tych komórek.

2. Ocena włókien nerwowych

Przeprowadzone badania uwidocznily rozmieszczenie i zagęszczenie włókien nerwowych w obrębie okolicy okołowierzchołkowej zęba bez stwierdzonych okołowierzchołkowych zmian zapalnych (grupa kontrolna). Większość włókien nerwowych tej okolicy zmierza do otworu wierzchołkowego, aby następnie osiągnąć miazgę zęba. Tylko nieliczne włókna pozostają w obrębie ozębnej zapewniając jej unerwienie.

Barwienia przy użyciu PGP 9.5 zapewniły obraz wszystkich włókien nerwowych badanej okolicy. Przeprowadzono barwienia uwidaczniające poszczególne typy włókien nerwowych. Większość uwidocznionych włókien to włókna czuciowe, jako że miazga zęba jest strukturą bardzo bogato unerwioną w tym zakresie. Pozostaje to w zgodzie z doniesieniami z literatury, które wskazują na ok. 10-cio procentowy udział włókien nerwowych układu autonomicznego w unerwieniu miazgi zęba (84). Włókna te przebiegają wraz z naczyniami krwionośnymi.

Przeprowadzone badania nie wykazały obecności włókien VIP (+). Uważa się, że włókna zawierające VIP należą w głównej mierze do układu parasympatycznego. Unerwienie parasympatyczne miazgi zębów jest nadal sprawą dyskusyjną. Część

autorów twierdzi, że taki typ unerwienia jest obecny w zakresie miazgi zęba (29,85), podczas gdy inni autorzy nie odnajdują tego typu włókien (86,87).

W przeprowadzonych badaniach nie wykazano włókien zawierających VIP ani w grupie kontrolnej ani w przebiegu ostrych i przewlekłych procesów zapalnych.

Wykonane barwienia wykazały wzrost ilości i zmianę rozmieszczenia włókien PGP (+), CGRP/SP (+), NPY (+). Dane te są zgodne z wynikami uzyskanymi przez innych autorów – Haug i Heyeraas wykazali wzrost ilości włókien NPY w okolicy okołowierzchołkowej zęba oraz w ożębnej po 20 dniach od obnażenia miazgi (87); inni autorzy wskazują na wzrost ilości włókien czuciowych już 1 dzień po urazie miazgi oraz na fakt zmniejszania się ich ilości po 3-4 tygodniach od zadziałania czynnika uszkodzającego (83,88).

Znaczny wzrost ilości włókien nerwowych w przebiegu procesów zapalnych okolicy okołowierzchołkowej zęba wskazuje na silny udział tych włókien oraz wydzielanych przez nie mediatorów w przebiegu tych reakcji.

Przeprowadzone badania nie pozwoliły na określenie odległości czasowej od momentu zadziałania czynnika uszkodzającego do momentu ekstrakcji zęba. W niektórych badanych próbkach pomimo toczącego się procesu zapalnego okolicy okołowierzchołkowej obserwowano mniejszą ilość włókien CGRP/SP (+) niż w innych preparatach tej samej grupy. Jednocześnie w tych preparatach obserwowano szczególnie zwiększoną ilość włókien NPY (+). Może to wskazywać na to, że preparaty te pochodziły ze zmian starszych niż 3-4 tygodnie od zadziałania urazu i był to okres

kiedy zanikały już włókna czuciowe a dochodziło do wzrostu ilości włókien układu sympatycznego.

Po podrażnieniu włókien typu C przez proces zapalny dochodzi do wydzielania z ich zakończeń CGRP. Neuropeptyd ten oddziałuje z komórkami układu immunologicznego w zakresie przebiegu i nasilenia reakcji zapalnej. Dochodzi do wzrostu wydzielania przez makrofagi mediatorów reakcji zapalnej, takich jak: cytokiny, tromboksany, prostaglandyny. Podobne działanie wykazuje SP, która wpływa na zwiększone wydzielanie IL-1 β ; IL-6 oraz TNF- α .

Czynniki te posiadają udowodniony udział w resorpcji kości wyrostka zębodołowego oraz korzenia zęba (89). Wykazano wzrost wydzielania SP w odpowiedzi na toczący się proces próchnicowy w zębie, ponadto wykazano wyższe stężenia SP w zębach z obecnością dolegliwości bólowych niż w zębach bez jakichkolwiek objawów klinicznych toczącego się procesu zapalnego (55). Dane te pozostają w zgodzie z danymi uzyskanymi w przeprowadzonych badaniach.

W preparatach pochodzących od pacjentów z silnymi dolegliwościami bólowymi widoczne było znacznie większe zagęszczenie włókien SP(+) niż w preparatach pobranych od pacjentów bez klinicznych objawów procesu zapalnego. Obserwacja ta dotyczy jedynie grupy zapalenia przewlekłego. Może to wskazywać na udział SP w odczuwaniu bodźców bólowych, lecz całkowite wyjaśnienie tej zależności wymaga dalszych badań.

Niektórzy autorzy wskazują jednakże na udział CGRP w procesach gojenia się kości wyrostka zębodołowego bazując na obserwacjach, że procesy reparacyjne tych tkanek rozpoczęły się w momencie, gdy przyrost ilości włókien CGRP (+) osiągnął swoje maksimum (83). Podobne wyniki można odnaleźć w stosunku do CGRP i SP po ocenie ich bezpośredniego oddziaływania na hodowlę komórek miazgi podobnych do fibroblastów (90). Caviedes-Bucheli i wsp. wskazują na rolę CGRP w modulacji odpowiedzi ze strony makrofagów i wzmożeniu w ten sposób procesów regeneracyjnych tkanek (91).

Podobnie działanie ograniczające proces zapalny wykazuje układ współczulny oraz wydzielane z jego włókien nerwowych noradrenalina i NPY, które posiadają kluczowy wpływ na przebieg reakcji zapalnej. Uwolnienie tych czynników wpływa nie tylko na obkurczenie się naczyń krwionośnych, ale również na przemiany limfocytów oraz na wydzielanie cytokin.

Generalnie układ sympatyczny posiada hamującą rolę w stosunku do mechanizmów immunologicznych oraz przebiegu reakcji zapalnej (92-94). Wykazano, że brak unerwienia sympatycznego prowadził do powstania większych zmian okołowierzchołkowych oraz do zwiększonej ilości osteoblastów na obwodzie tych zmian (95). Ponadto w przypadku resorpcji spowodowanej ortodontycznym przemieszczeniem zęba jej zakres był większy w przypadku braku unerwienia sympatycznego (95).

Obok noradrenaliny neuropeptydem obecnym we włóknach adrenergicznych jest NPY. Jego rola w przebiegu procesów zapalnych nie jest do końca poznana. Wiadomo,

że NPY reguluje przepływ krwi w obrębie miazgi zęba i wpływa na układ immunologiczny. Jest on również naczyniowym czynnikiem wzrostu, więc może odgrywać ważną rolę w procesach rewaskularyzacji zachodzących podczas reakcji naprawczych. Pełne wyjaśnienie roli tego neuropeptydu i wpływu układu sympatycznego na przebieg procesów zapalnych wymaga dalszych badań. Istnieje teoretyczna możliwość wykorzystania NPY w ograniczeniu procesu zapalnego i resorpcji kości wyrostka zębodołowego.

Zmiany zapalne miazgi zęba i okolicy okołowierzchołkowej są złożonymi procesami, w których współuczestniczą zarówno układ immunologiczny, układ naczyniowy, jak i układ nerwowy. Szereg procesów mediowanych przez te układy może doprowadzić do ograniczenia reakcji zapalnej i wygojenia się tkanek objętych tym patologicznym procesem lub do tzw. zapalenia neurogennego prowadzącego do martwicy miazgi i zmian zapalnych okolicy okołowierzchołkowej. Złożoność tych procesów uniemożliwia w chwili obecnej szczegółowe i kompletne poznanie wszystkich reakcji i zależności tam zachodzących. Aktualne badania dokładają, choć częściowo, szereg danych do bardzo złożonych procesów związanych z układem naczyniowym, nerwowym i immunologicznym w stanach zapalnych miazgi zęba i okolicy okołowierzchołkowej.

3. Ocena zmian składu pierwiastkowego

W przebiegu okołowierzchołkowych procesów zapalnych dochodzi do zmiany składu pierwiastkowego zębów w zakresie takich pierwiastków, jak: tlen, fluor, sód, fosfor, siarka, wapń, stront, żelazo i kadm. Jednocześnie zawartość magnezu i potasu

pozostała praktycznie na tym samym poziomie. Magnez jest ważnym pierwiastkiem aktywującym wiele procesów enzymatycznych organizmu, stąd ocena zmian jego poziomu w przebiegu reakcji zapalnych jest niezwykle ważna. Toczące się procesy zapalne doprowadziły do wzrostu poziomu fluoru, fosforu oraz kadmu w porównaniu z grupą kontrolną; obniżeniu uległy poziomy tlenu, sodu i wapnia. Sód jest pierwiastkiem ważnym do życia, głównym ilościowo kationem zewnątrzkomórkowym. Zawartość siarki, żelaza, cynku oraz strontu początkowo nieznacznie obniżyły się w przebiegu zapaleń ostrych a następnie gwałtownie wzrosły podczas toczącego się procesu przewlekłego. Stosunek wapnia do fosforu (Ca/P) sukcesywnie podwyższał się w wyniku toczących się procesów zapalnych, co wskazuje na większą mineralizację tkanek twardych zęba jako następstwo reakcji zapalnej. Obserwacje innych autorów (70,71) odbiegają nieznacznie w zakresie uzyskanych wartości poziomu poszczególnych mikroelementów, lecz spowodowane to jest prawdopodobnie oceną w zakresie zębiny koronowej, podczas gdy w obecnej pracy ocenie poddano okolicę okołowierzchołkową zęba.

VII. Wnioski

W przebiegu okołowierzchołkowych procesów zapalnych w zakresie zębów ludzkich dochodzi do:

1. Zmian w zakresie składu pierwiastkowego tkanek twardych zęba:

- a. Wzrostu poziomów fluoru, fosforu oraz kadmu w porównaniu z grupą kontrolną, co może sugerować obniżenie stopnia mineralizacji tkanek twardych poprzez wymianę w ich strukturze jonów wapnia na jony fluoru
- b. Obniżenia poziomów tlenu, sodu i wapnia, co wskazuje na tlenowy przebieg toczących się procesów zapalnych oraz na zmniejszenie stopnia mineralizacji tkanek twardych zęba w przebiegu tych procesów
- c. Poziomy siarki, żelaza, cynku oraz strontu początkowo nieznacznie obniżyły się w przebiegu zapaleń ostrych a następnie gwałtownie wzrosły podczas toczącego się procesu przewlekłego, co wskazuje na bardziej agresywny przebieg ostrej fazy zapalenia niż fazy przewlekłej
- d. Zawartość magnezu i potasu pozostała praktycznie na tym samym poziomie

2. Zmian składu komórkowego i rozmieszczenia komórek prozapalnych w okolicy okołowierzchołkowej zęba:

- a. W zębach bez cech zapalenia okołowierzchołkowego (grupa kontrolna) wykazano nieznaczną obecność komórek zapalnych, co mogło być

wywołane mikrourazami podczas funkcjonowania zęba lub urazem związanym z ekstrakcją

- b. W przebiegu zapalenia ostrego doszło do wzrostu ilości zarówno granulocytów, jak i makrofagów w zakresie miazgi zęba oraz okolicy okołowierzchołkowej, co uwidacznia prawidłowy przebieg procesu immunologicznego w zakresie tkanek zęba
- c. W przebiegu zapalenia przewlekłego wykazano zwiększoną ilość limfocytów – zarówno typu T jak i B oraz makrofagów. Wykazano przewagę liczebną limfocytów typu T nad limfocytami typu B. Jest to zgodne z obserwacjami klinicznymi polegającymi na destrukcji tkanki kostnej i rozprzestrzenianiu się stanu zapalnego. Pokazuje to również współistnienie odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego oraz humoralnego.
- d. Wykazano zmianę rozmieszczenia komórek prozapalnych w zależności od typu zmiany, co wskazuje na dynamiczny przebieg procesów zapalnych.

3. Zmian rozmieszczenia i typu włókien nerwowych

- a. W grupie kontrolnej uwidoczniono bogate unerwienie okolicy okołowierzchołkowej w postaci mieszaniny dużych i małych, rozgałęzionych pęczków włókien nerwowych zmierzających do otworu wierzchołkowego zęba
- b. W grupie zębów z toczącym się okołowierzchołkowym procesem zapalnym o typie ostrym dochodzi do zwiększenia się ilości włókien nerwowych PGP (+) SP(+), CGRP(+) oraz NPY(+), które tworzyły coraz

gęstsze sieci. Może to sugerować silny udział neuromediatorów wydzielanych przez te włókna w przebiegu reakcji zapalnych.

- c. W grupie zębów z toczącym się okołowierzchołkowym procesem zapalnym o typie przewlekłym doszło do dalszego wzrostu ilości włókien nerwowych. Co potwierdza udział neuromediatorów włókien nerwowych w przebiegu zmian zapalnych.
- d. W przypadku zmian zapalnych (ziarniniaków oraz początkowych stadiów torbieli okołowierzchołkowej) dochodziło do zmiany lokalizacji wszystkich włókien nerwowych – włókna w dużej ilości i tworzące gęste sieci znajdowały się na obwodzie zmiany a we wnętrzu przeważały liczne komórki reakcji zapalnej. Wskazuje to na współuczestnictwo układu immunologicznego oraz nerwowego w przebiegu reakcji zapalnych.

VIII. Streszczenie

W skład tkanek okołowierzchołkowych zęba, stanowiących część jego aparatu zawieszeniowego, wchodzi ozębna, więzadła, cement i kość wyrostka zębodołowego. Przez otwór wierzchołkowy zęba do miazgi wnikają naczynia krwionośne, naczynia limfatyczne oraz włókna nerwowe. Wszystkie struktury znajdujące się w tej okolicy mogą zostać włączone w przebieg procesów zapalnych. Zmiany te mogą szerzyć się zarówno z miazgi zęba do tkanek okołowierzchołkowych, jak i w kierunku przeciwnym (np. z okolicy przyzębia brzeżnego sięgając do wierzchołka zęba). Procesy patologiczne przebiegające w okolicy przyszczytowej zębów nie pozostają również bez wpływu na ich tkanki twarde i miazgę.

Ozębna okołowierzchołkowa jest strukturą bogato unaczynioną oraz unerwioną.

Dwie populacje włókien nerwowych zaopatrują błonę ozębną. Najliczniejsze są aferentne włókna czuciowe docierające do ozębnej drogą nerwów zębodołowych. Perykariony tych włókien znajdują się w zwoju nerwu trójdzielnego.

Drugą populację stanowią włókna układu autonomicznego, wywodzące się z komórek szyjnych splotów pnia sympatycznego, a docierające wzdłuż naczyń krwionośnych. Cienkie pęczki włókien nerwowych dochodzą do ozębnej od strony kości wyrostka zębodołowego w okolicy przywierzchołkowej zęba, a następnie oddają gałęzie biegnące w kierunku przyzębia brzeżnego. Takie rozmieszczenie topograficzne warunkuje większą gęstość włókien nerwowych w okolicy przyszczytowej niż w

wyższych rejonach ozębnej. W błonie ozębnej, w przeciwieństwie do miazgi zęba, oprócz wolnych zakończeń nerwowych znajdują się także korpuskularne receptory czucia (głównie ciała Ruffiniego) rejestrujące miejscowy ucisk.

Wstępną odpowiedzią tkanek ozębnej na infekcję bakteryjną jest przekrwienie: początkowo czynne - tętnicze, a następnie bierne - żyłne. Jeżeli czynnik drażniący nie zostanie usunięty, dochodzi do niespecyficznego oraz specyficznego zapalenia. Obserwuje się poszerzenie naczyń krwionośnych, uszkodzenia śródbłonka oraz zwiększenia przepuszczalności naczyń krwionośnych. W tym samym czasie przebiega również lokalna prezentacja antygenów, co doprowadza do migracji i aktywacji komórek - limfocytów odpowiedzialnych za swoistą odpowiedź immunologiczną (m. in. produkcję przeciwciał oraz cytokin).

Doniesienia naukowe wskazują, iż włókna nerwowe znajdujące się w okolicy wierzchołkowej zęba ulegają zmianom morfologicznym oraz neurochemicznym w przebiegu procesów zapalnych tej okolicy. Dochodzi do proliferacji włókien nerwowych oraz zmiany ich rozmieszczenia - włókna formują gęste sieci okalające miejsce procesu zapalnego lub są zlokalizowane pomiędzy martwą a żywą tkanką.

Jednocześnie dochodzi do zmian stopnia zmineralizowania tkanek twardych zęba tej okolicy, co wpływa na zmianę morfologii korzenia zęba w okolicy okołowierzchołkowej.

Celem pracy było:

1. Określenie typu histologicznego włókien nerwowych, jak również ich rozmieszczenia, w tkankach okołowierzchołkowych w zębach zdrowych oraz w trakcie ostrego i przewlekłego procesu zapalnego. Zaobserwowanie ewentualnego pojawiania się i wzrostu nowych włókien nerwowych w miejscu reakcji zapalnej.
2. Zbadanie w oparciu o SEM oraz mikroanalizę RTG składu pierwiastkowego tkanek twardych zęba zdrowego oraz zębów objętych procesem zapalnym. Poprzez porównanie dokonanie oceny zmiany stopnia mineralizacji tych tkanek oraz ewentualnych zmian morfologii zęba tej okolicy.
3. Stwierdzenie w obrazach SEM, w kanałach zębów obecności naczyń, komórek miazgi oraz stanu tych elementów.

Materiał do badań stanowiły zęby pochodzące ze wszystkich grup zębowych (siekacze, kły, zęby przedtrzonowe oraz trzonowe) uzyskane od pacjentów zgłaszających się do Zakładu Chirurgii Stomatologicznej Instytutu Stomatologii UJ CM ze wskazaniem do ekstrakcji z przyczyn ortodontycznych oraz ostrych i przewlekłych stanów zapalnych okolicy okołowierzchołkowej. Badania przeprowadzane były wyłącznie na uzębieniu stałym (wiek pacjentów od 16 do 80 roku życia), pochodzącym od pacjentów bez dolegliwości ogólnoustrojowych mogących wpływać na morfologię i skład pierwiastkowy zębów oraz ich aparatu zawieszeniowego.

Badania przeprowadzono w następujących grupach:

1. zębów usuniętych w przypadkach z typowymi objawami klinicznymi zapaleń okołowierzchołkowych zębów, potwierdzonych badaniem radiologicznym w przebiegu:
 - a) okołowierzchołkowych ostrych stanów zapalnych,
 - b) okołowierzchołkowych przewlekłych stanów zapalnych nie poddanych leczeniu endodontycznemu,
2. kontrolnej, którą stanowiły zęby usunięte ze wskazań ortodontycznych przy braku cech zapalenia w badaniu klinicznym i obrazie radiologicznym.

Pobrane od pacjentów zęby – zakwalifikowane do przeglądowych barwień histologicznych lub do wykonania reakcji immunohistochemicznych - utrwalono immersyjnie w 4% zbuforowanym paraformaldehydzie, a następnie odwapniono w roztworze 5% kwasu solnego (HCl) oraz 5% kwasu mrówkowego. Następnie przygotowano skrawki mrożeniowe, na których wykonano:

1. histologiczne barwienia przeglądowe (HE, AZAN, błękit toluidynowy i in.);
2. reakcje immunohistochemiczne przy zastosowaniu przeciwciał dla markerów komórek reakcji zapalnej i odpowiedzi immunologicznej:
 - a. CD3 – obecny na wszystkich subpopulacjach limfocytów T,
 - b. CD4 – identyfikujący limfocyty T pomocnicze,
 - c. CD8 – uwidaczniające limfocyty T cytotoksyczne oraz supresorowe,
 - d. CD20 – identyfikujący limfocyty B,

- e. HLA/DR – obecny na komórkach prezentujących antygen i limfocytach B,
- f. CD68 – uwidaczniający makrofagi;
- g. CD11c – obecny na neutrofilach, makrofagach, monocytach, granulocytach, komórkach NK oraz limfocytach T

3. reakcje immunohistochemiczne przy zastosowaniu przeciwciał dla markerów różnych populacji włókien:

- a. calcitonin gene-related peptide (CGRP) oraz substancja P (SP) - neuropeptydy charakterystyczne dla włókien czuciowych pochodzących z pierwotnych neuronów czuciowych zwojów trójdzielnych,
- b. neuropeptyd Y (NPY) – kotransmitter obecny w adrenergicznych włóknach układu współczulnego,
- c. wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP) – kotransmitter włókien cholinergicznego układu współczulnego,
- d. protein gene product 9.5 (PGP 9.5) – znacznik panneuronalny, białko obecne w perykarionach i wypustkach wszystkich populacji komórek nerwowych.

Zęby, które zostały zakwalifikowane do oceny w skaningowym mikroskopie elektronowym po usunięciu utrwalono w 4% zbuforowanym paraformaldehydzie przez 3 godziny, a następnie materiał odpłukano w wodzie destylowanej przez 5 godzin. Po otwarciu komór zębów zęby poddano kontrastowaniu 1% czterotlenkiem osmu buforowanym buforem fosforanowym do pH 7,4 i odwodniono preparaty we wzrastających stężeniach alkoholu: 30%, 50%, 80%, 90% i 100%. Następnie

umieszczono je w komorze próżniowej na 24 godziny, przyklejono do holdera klejem przewodzącym prąd (zawierającym bardzo drobne opiłki srebra) i poddano naparowaniu cienką warstwą złota w spaterze.

Ocena przygotowanych preparatów była przeprowadzona odpowiednio w mikroskopie optycznym, fluorescencyjnym, a w wytypowanych przypadkach w skaningowym mikroskopie elektronowym (typ JEOL-JSM-35CP).

Ponadto w celu określenia składu pierwiastkowego badanych tkanek wybrane przypadki zostały poddane mikroanalizie RTG zarówno w przyszyjkowej jak i przyszczytowej części zęba.

W przebiegu okołowierzchołkowych procesów zapalnych w zakresie zębów ludzkich dochodzi do wzrostu poziomów fluoru, fosforu oraz kadmu w porównaniu z grupą kontrolną, a obniżenia poziomów tlenu, sodu i wapnia. Jednocześnie poziomy siarki, żelaza, cynku oraz strontu początkowo nieznacznie obniżyły się w przebiegu zapaleń ostrych a następnie gwałtownie wzrosły podczas toczącego się procesu przewlekłego. Zawartość magnezu i potasu pozostała praktycznie na tym samym poziomie

W zębach bez cech zapalenia okołowierzchołkowego (grupa kontrolna) wykazano nieznaczną obecność komórek zapalnych. W przebiegu zapalenia ostrego doszło do wzrostu ilości zarówno granulocytów, jak i makrofagów w zakresie miazgi zęba oraz okolicy okołowierzchołkowej, a w przebiegu zapalenia przewlekłego wykazano zwiększoną ilość limfocytów – zarówno typu T jak i B oraz makrofagów.

Wykazano przewagę liczebną limfocytów typu T nad limfocytami typu B. Wykazano zmianę rozmieszczenia komórek prozapalnych w zależności od typu zmiany

W grupie kontrolnej uwidoczniło bogate unerwienie okolicy okołowierzchołkowej w postaci mieszaniny dużych i małych, rozgałęzionych pęczków włókien nerwowych zmierzających do otworu wierzchołkowego zęba. W grupie zębów z toczącym się okołowierzchołkowym procesem zapalnym o typie ostrym dochodzi do zwiększenia się ilości włókien nerwowych PGP (+) SP(+), CGRP(+) oraz NPY(+), które tworzyły coraz gęstsze sieci. W grupie zębów z toczącym się okołowierzchołkowym procesem zapalnym o typie przewlekłym doszło do dalszego wzrostu ilości włókien nerwowych. W przypadku zmian zapalnych (ziarniniaków oraz początkowych stadiów torbieli okołowierzchołkowej) dochodziło do zmiany lokalizacji wszystkich włókien nerwowych – włókna w dużej ilości i tworzące gęste sieci znajdowały się na obwodzie zmiany a we wnętrzu przeważały liczne komórki reakcji zapalnej.

IX. Summary

Periodontal tissues, which constitute a part of tooth's fixation, consist of periodontium, ligaments, cementum and alveolar bone. Through the apical foramen blood and lymphatic vessels together with nerves enter towards dental pulp. All structure of this surrounding may be involved in inflammatory processes. Those processes may develop either from dental pulp to periodontal tissues or in opposite direction (e.g. from gingival sulcus to periodontal region). Pathologic processes of periapical tissues influence hard tissues of the tooth and its pulp.

Periodontal tissue is richly vascularized and innervated.

Two types of neural fibers innervate periodontal tissues. Most numerous are afferent sensorial fibers, which run through alveolar nerves. Pericarions of those fibers lay in trigeminal ganglion.

Second type consist of autonomic fibers, which come from sympathetic ganglions and run with blood vessels. Thin neural fibers arrive to periodontal tissues towards alveolar bone near the apex of the tooth, and there those fibers give branches which run to gingival sulcus. This type of topographic location leads to higher consistence of neural fibers in periapical region than in higher parts of periodontium. Periodontium, contrary to the dental pulp, include not only free nerve endings but also corpuscular sense receptors (Ruffini endings), which register local pressure.

Initial response of periodontal tissues to bacterial infection is a congestion: initially active – arterious, and than passive – venous. If irritating factor is not removed the non-specific and specific inflammatory response begins. Blood vessels widen, endothelium is being damaged and blood vessels permeability raises. In the same time local presentation of antigens occurs, which leads to migration and activation of cells – lymphocytes responsible for specific immunologic response (e.g. antibodies production).

Literature review indicates that nerve fibers present in periapical region change morphologically and neuro-chemically during inflammatory processes. They proliferate and change location forming thick nets around the infalmattory region or localize between necrotic and vital tissue.

Furthermore mineralization degree of tooth hard tissues change, which influence the morphology of periapical region.

The aim of this study was:

1. Describe histologic type of nerve fibers, as well as its location in periodontal tissues of healthy teeth and teeth with acute and chronic inflammation. Observation and description of every newly formed nerve fibers in the region of inflammation.
2. Description of elemental composition of healthy and inflamed tooth hard tissues according to SEM and X-ray microanalysis. Description of any possible change of mineralization degree and morphology of those tissues made by comparison.

3. Description of vessels and cells in root canal and estimation of those elements state according to SEM.

Material consisted of teeth which belong to all teeth groups (incisors, canines, premolars and molars) collected from patients treated in Dental surgery Department of Jagiellonian University Collegium Medicum Dental School. Teeth were extracted due to orthodontic or periapical inflammatory (acute and chronic) indications. Material consists of permanent dentition only (age of patients 16-80), from patients without any systemic diseases which may influence the morphology and elemental composition of teeth and periodontal tissues.

The analysis was carried out on following groups:

1. teeth extracted due to typical symptoms of periapical inflammation, confirmed by x-ray diagnosis:
 - a. periapical acute inflammation
 - b. periapical chronic inflammation not treated endodontically
2. control group consisting of teeth extracted due to orthodontic indications and no inflammatory symptoms in dental and x-ray examination.

Extracted teeth – qualified to histological and immunohistochemical dyeing – were preserved in 4% formalin and than decalcified in solution of 5% HCl and 5% HCOOH. Than frozen slices were prepared and dyed:

1. histologic standard dyeing
2. immunohistochemical dyeing with the usage of antibodies for inflammatory reaction cells:
 - a. CD3 – present on all subpopulations of lymphocytes T,
 - b. CD4 – present on lymphocytes T helper,
 - c. CD8 – present on lymphocytes T cytotoxic and suppressor,
 - d. CD20 – present on lymphocytes B,
 - e. HLA/DR – present on antigen presenting cells and lymphocytes B,
 - f. CD68 – present on macrophages
 - g. CD11c – present on neutrophils, macrophages, monocytes, granulocytes, NK cells and lymphocytes T
3. immunohistochemical dyeing with the usage of antibodies for nerve fibers:
 - a. calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP) – neuropeptides characteristic for sensory nerves
 - b. neuropeptide Y (NPY) – co-transmitter present in adrenergic nerve fibers
 - c. vasoactive intestinal peptide (VIP) – co-transmitter of cholinergic nerve fibers
 - d. protein gene product 9.5 (PGP 9.5) – panneuronal marker, protein present in pericarions and appendixes of all types of neuronal cells

Teeth which were qualified to scanning electron microscope evaluation were preserved in 4% formalin for 3 hours and than rinsed in distilled water for 5 hours. After opening of teeth chambers the material was contrasted with 1% osmium four oxide buffored with phosphate buffer to pH 7,5 and dehydrated in increasing concentrations of alcohol: 30%, 50%, 80%, 90% and 100%. Than material was placed in vacuum

chamber for 24 hours, glued to holder with glue which transmits electricity (containing very small parts of silver) and than covered with thin layer of gold in spatter.

The evaluation of prepared material will be carried out in light microscope, fluorescent microscope and in chosen cases in scanning electron microscope (type JEOL-JSM-35CP).

Furthermore to evaluate elemental composition of analyzed tissues chosen cases were analyzed in X-ray microanalyzer both in pericervical and periapical part.

In periapical inflammatory processes in human teeth levels of fluoride, phosphorus and cadmium raised in comparison with control group, and levels of oxide, sodium and calcium decreased. In the same time levels of sulphur, iron, zinc and strontium initially slightly decreased during acute inflammatory processes and than dramatically increased during chronic phase. Levels of magnesium and potassium stayed on the same level.

In control group sparse inflammatory cells were found. During acute inflammatory process levels of granulocytes and macrophages increased both in dental pulp and periapical region, and in chronic phase increased levels of lymphocytes – both type T and B and macrophages were found. More lymphocytes type T were found than type B ones. Various location of inflammatory cells according to lesion type was found.

In control group reach innervation of periapical region was found. It was formed as composition of large and small, branched nerve fibers running towards the apical

foramen. During periapical inflammatory processes of acute type PGP(+), SP(+), CGRP(+) and NPY(+) nerve fibers number increase. Furthermore those fibers formed more concentrated networks. In chronic type of inflammation further increase of nerve fibers was observed. In periapical lesions (granulomas and initial stages of periapical cysts) localization of all types of nerve fibers changed – fibers forming concentrated networks were localized outside of the lesion and inside the predominance of inflammatory cells was observed.

X. Tabele

Tabela 1. Typy włókien nerwowych

Typ włókna	Średnica	Prędkość przewodzenia bodźców	Główna funkcja
A α	12-22 μm	70-120 m/s	motoryczna: propriocepcja
A β	5-12 μm	30-70 m/s	czuciowa: dotyk, nacisk
A γ	3-6 μm	15-30 m/s	motoryczna: ściągna mięśniowe
A δ	2-5 μm	12-30 m/s	czuciowa: ostry ból
B	<3 μm	3-15 m/s	autonomiczne włókna przedzwojowe
C	<2 μm	0,5-2 m/s	czuciowa: tępy ból autonomiczne włókna pozazwojowe

Tabela 2 – Bodźce aktywujące poszczególne typy włókien nerwowych w miążdze zębów zdrowych i w przebiegu procesu zapalnego. Legenda: A- δ^H – włókna typu A- δ szczególnie wrażliwe na bodźce hydrodynamiczne; Z – zębina; M – miążga; + - istnieją dowody na reakcję; +/- - mieszane dowody na reakcję; - - brak dowodów na reakcję

	Stan fizjologiczny				Stan zapalny			
	A- β	A- δ	A- δ^H	C	A- β	A- δ	A- δ^H	C
Miejsce odbioru bodźca	Z	Z	M	M	Z	Z	Z,M	M
<u>Bodziec</u>								
Mechaniczny (nie wywołujący zmian)	+/-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrodynamiczny	+	+	-	-	+	+	+	-
Intensywne oziębianie	+	+	+	+	+	+	+	+
Intensywne ogrzewanie	-	-	?	+	?	?	?	?
Serotonina	+	+	?	-	+	+	?	?
Histamina	-	-	?	+	-	-	?	?
Bradykinina	-	-	?	+	-	-	?	?
Kapsaicyna	-	-	+/-	+	-	-	?	+
Olej musztardowy	+	+	?	?	?	?	?	?
<u>Tworzenie procesu (zapalnego)</u>	-	-	-	-	+	+	+	+
<u>Doznania</u>								
„Przedbólowe”	+	+	?	-				
Ostry ból	+	+	?	-				
Tępy ból	-	-	?	+				

Tabela3. Inne funkcje włókien unerwiających zęby

Działanie	Neuromediatory	Źródło	Bodźce wywołujące	Miejsce działania
Rozszerzenie naczyń krwionośnych	SP/NKA CGRP Ach, VIP, PHI	Czuciowe włókna nerwowe Parasympatyczne włókna nerwowe	Lokalne ciśnienie krwi Lokalne ciśnienie tkanek Bodźce szkodliwe Odległe odruchy autonomiczne	naczynia krwionośne włókna nerwowe układu sympatycznego naczynia krwionośne ozębnej (i miazgi?)
Zwężenie naczyń krwionośnych	NE, NPY ET SOM	Sympatyczne włókna nerwowe Endotelium Czuciowe włókna nerwowe	Aktywność współczulna Napięcie naczyniowe ?	naczynia i włókna układu czuciowego naczynia i włókna układu czuciowego
Wypływ płynu kanalikowego	CGRP SP/NKA	Czuciowe włókna nerwowe	Siły hydrodynamiczne Lokalne ciśnienie tkankowe	naczynia krwionośne
Napływ płynu kanalikowego	NE	Unerwienie współczulne	Lokalne ciśnienie tkankowe	naczynia krwionośne
Tworzenie zębiny	CGRP	Unerwienie czuciowe	Bodźce hydrodynamiczne	odontoblasty
Funkcja komórek miazgi	NGF	fibroblasty, komórki Schwanna	Aktywność lub uraz komórek miazgi	odontoblasty, fibroblasty, komórki dendrytyczne, naczynia krwionośne
Funkcja czuciowa nerwów	CGRP	Nerwy czuciowe	Hydrodynamiczne bodźce uszkodzająca	włókna nerwowe, naczynia krwionośne, odontoblasty, fibroblasty, komórki Schwanna
i lokalizacja	NGF	fibroblasty, komórki dendrytyczne	j.w.	j.w.

Tabela 4. Sposoby produkcji neuroprzekazników

Typ 1	Odpowiednie ilości są syntetyzowane i przechowywane w warunkach fizjologicznych Przykłady: SP i CGRP w neuronach czuciowych, GAL w neuronach podwzgórza, VIP i NPY w neuronach kory mózgowej
Typ 2	Bardzo małe ilości w warunkach fizjologicznych Bodziec niezbędny do wywołania syntezy Przykłady: VIP, GAL i NPY w neuronach czuciowych
Typ 3	Przemijająca produkcja w okresie rozwojowym Przykłady: SOM w CSN, CGRP w neuronach ruchowych kurczaka, GAL w pierwotnych neuronach czuciowych

Tabela 5. Pierwotne przeciwciała użyte do barwień immunohistochemicznych

Antygen (skrót)	Gatunek / rodzaj przeciwciał	Rozcieńczenia robocze	Producent, nr katalogowy
Protein gene product 9.5 (PGP 9.5, PGP)	królicze poliklonalne	1:500	Chemicon, AB1761
Calcitonin gene-related peptide (CGRP)	królicze poliklonalne	1:500	Biomol, CA1134
Substancja P (SP)	królicze poliklonalne	1:1000	Chemicon, AB1566
Neuropeptyd Y (NPY)	królicze poliklonalne	1:400	Biomol, NA1233
Vasoactive intestinal polypeptide (VIP)	królicze poliklonalne	1:400	Chemicon, AB982
CD68	mysie monoklonalne	1:1	Chemicon, ICHR2113-6
CD11c	mysie monoklonalne	1:100	Novocastra, NCL-L-CD11c-563
HLA-DR	mysie monoklonalne	1:50	Novocastra, NCL-LN3
CD3	mysie monoklonalne	1:200	Novocastra, NCL-CD3-565
CD8	mysie monoklonalne	1:1	Chemicon, ICHR2114-6
CD20	mysie monoklonalne	1:100	Novocastra, NCL-CD20-7D1
mieloperoksydaza (MPO)	mysie monoklonalne	1:100	Novocastra, NCL-MYELO

Tabela 6. Struktury uwidaczniane przez poszczególne przeciwciała pierwotne

Znacznik	Uwidaczniana struktura
PGP 9.5	wszystkie włókna nerwowe (znacznik panneuronalny)
CGRP	czuciowe włókna nerwowe
SP	czuciowe włókna nerwowe
NPY	adrenergiczne pozazwojowe włókna układu współczulnego
VIP	pozazwojowe cholinergiczne włókna układu współczulnego / włókna pozazwojowe układu przywspółczulnego
CD 68	makrofagi
CD11c	makrofagi, rzadziej granulocyty
HLA-DR	komórki prezentujące antygen, limfocyty B
CD 3	limfocyty T
CD 8	limfocyty T cytotoksyczne / supresorowe, komórki NK
CD 20	limfocyty B
MPO	granulocyty obojętnochłonne

Tabela 7. Wartości średnie uzyskane w wyniku mikroanalizy RTG – próbka 2.6**(grupa kontrolna)**

Pierwiastek	Średnia ze wszystkich pomiarów wt%	Średnia dla próby 1	Średnia dla próby 2a	Średnia dla próby 2b
O	24,250	19,861	29,986	28,441
F	0,492	0,785	0,137	0,191
Na	2,824	3,386	3,520	1,143
Mg	1,500	1,069	3,614	0,672
P	28,882	29,753	26,675	28,904
S	5,349	7,759	3,580	1,945
K	0,625	0,707	0,988	0,171
Ca	32,556	32,109	28,603	36,611
Fe	1,677	2,573	0,446	0,869
Zn	1,177	BRAK DANYCH	0,000	2,354
Sr	0,375	0,263	0,745	0,303
Cd	1,347	1,737	1,707	0,280
Ca/P	1,127	1,079	1,072	1,267

Tabela 8. Wartości średnie uzyskane w wyniku mikroanalizy RTG – próbka 2.7**(grupa kontrolna)**

Pierwiastek	Średnia ze wszystkich pomiarów wt%	Średnia dla próby 1	Średnia dla próby 2a	Średnia dla próby 2b
O	19,676	15,286	17,330	34,172
F	0,201	0,350	0,000	0,131
Na	1,597	1,155	2,182	1,827
Mg	0,775	0,658	0,933	0,832
P	26,918	32,214	19,305	25,095
S	1,662	2,460	0,752	1,031
K	0,445	0,058	1,333	0,083
Ca	41,128	43,882	40,283	35,510
Fe	2,772	0,934	7,234	0,676
Zn	15,291	9,206	21,375	bd
Sr	0,311	0,275	0,471	0,163
Cd	1,425	0,888	3,055	0,324
Ca/P	1,528	1,362	2,087	1,415

Tabela 9. Wartości średnie uzyskane w wyniku mikroanalizy RTG – próbka 2.13**(grupa kontrolna)**

Pierwiastek	Średnia ze wszystkich pomiarów wt%	Średnia dla próby 1	Średnia dla próby 2	Średnia dla próby 3	Średnia dla próby 4	Średnia dla próby 5	Średnia dla próby 6
O	21,406	24,955	21,797	28,956	16,955	13,194	21,268
F	0,186	0,107	0,000	0,000	0,000	0,236	0,862
Na	3,068	2,369	2,377	3,967	3,053	3,334	3,775
Mg	0,693	0,662	0,583	0,747	1,126	0,288	0,797
P	32,711	31,197	33,036	29,938	34,376	35,538	32,579
S	3,729	3,399	3,471	3,593	3,600	3,498	5,011
K	0,332	0,402	0,433	0,167	0,461	0,340	0,129
Ca	35,864	35,284	36,210	31,051	38,431	41,740	32,547
Fe	1,222	1,114	1,186	1,034	1,138	1,270	1,636
Zn							
Sr	0,091	0,059	0,087	0,113	0,157	0,088	0,057
Cd	0,700	0,453	0,822	0,434	0,720	0,474	1,339
Ca/P	1,096	1,131	1,096	1,037	1,118	1,175	0,999

Tabela 10. Wartości średnie uzyskane w wyniku mikroanalizy RTG – próbka 2.5
(grupa zapalenia ostrego)

Pierwiastek	Średnia ze wszystkich pomiarów wt%	Średnia dla próby 1	Średnia dla próby 2	Średnia dla próby 3a	Średnia dla próby 3b
O	29,105	27,875	28,156	30,707	29,760
F	0,084	0,000	0,206	0,000	0,000
Na	1,911	2,328	2,229	1,165	2,001
Mg	0,821	0,382	0,672	1,324	0,731
P	25,187	28,018	27,360	20,698	24,907
S	2,231	1,119	0,545	4,806	3,000
K	0,285	0,061	0,091	0,676	0,301
Ca	34,159	39,586	39,953	23,574	32,931
Fe	0,571	0,273	0,399	0,712	0,969
Zn	26,761	BRAK DANYCH	BRAK DANYCH	13,388	4,987
Sr	0,128	0,131	0,086	0,483	0,236
Cd	0,963	0,225	0,303	52,467	75,178
Ca/P	1,356	1,413	1,460	1,139	1,322

Tabela 11. Wartości średnie uzyskane w wyniku mikroanalizy RTG – próbka 2.9**(grupa zapalenia ostrego)**

Pierwiaszek	Średnia ze wszystkich pomiarów wt%	Średnia dla próby Korona1	Średnia dla próby Korona2	Średnia dla próby Korzen	Średnia dla próby Rdzen1	Średnia dla próby Rdzen2	Średnia dla próby Rdzen3
O	16,658	17,939	15,951	19,337	8,358	13,915	20,496
F	0,687	0,660	0,000	0,834	0,000	1,790	1,972
Na	2,223	3,433	1,731	2,353	1,024	1,909	1,455
Mg	1,011	0,726	0,835	0,959	1,949	0,849	1,674
P	30,631	32,719	31,385	28,193	34,788	28,346	27,622
S	1,959	1,924	2,057	1,824	2,124	1,981	2,007
K	0,600	0,192	0,491	0,640	0,832	0,820	1,575
Ca	40,808	37,827	42,839	40,030	45,144	43,770	36,303
Fe	3,373	3,125	3,582	3,268	4,724	3,713	1,391
Zn	BRAK DANYCH	BRAK DANYCH	BRAK DANYCH	BRAK DANYCH	BRAK DANYCH	BRAK DANYCH	BRAK DANYCH
Sr	0,415	0,368	0,341	0,261	0,399	0,145	1,882
Cd	1,635	1,086	0,788	2,303	0,657	2,763	3,625
Ca/P	1,332	1,156	1,365	1,420	1,298	1,544	1,314

Tabela 12. Wartości średnie uzyskane w wyniku mikroanalizy RTG – próbka 2.12**(grupa zapalenia ostrego)**

Pierwiastek	Średnia ze wszystkich pomiarów wt%	Średnia dla próby 1	Średnia dla próby 2	Średnia dla próby 3	Średnia dla próby 4	Średnia dla próby 5	Średnia dla próby 6	Średnia dla próby 7
O	14,758	17,569	15,764	10,229	9,549	17,468	13,190	25,271
F	0,367	0,569	0,026	0,000	0,000	0,029	1,416	0,999
Na	2,311	2,228	2,316	2,088	1,305	2,838	2,195	5,085
Mg	0,566	0,740	0,253	0,996	0,258	0,816	0,356	0,631
P	35,224	33,306	35,767	36,826	37,712	33,556	36,421	29,881
S	4,447	4,174	3,257	4,425	4,086	4,862	5,756	6,270
K	0,181	0,134	0,253	0,192	0,162	0,219	0,182	0,000
Ca	39,402	38,149	39,887	42,374	44,723	37,092	38,447	27,397
Fe	1,594	1,223	1,389	1,873	1,237	2,195	1,436	2,810
Zn	BRAK DANY CH	BRAK DAN YCH	BRAK DAN YCH	BRAK DAN YCH	BRAK DAN YCH	BRAK DAN YCH	BRAK DAN YCH	BRAK DANYCH
Sr	0,080	0,147	0,192	0,038	0,000	0,000	0,000	0,216
Cd	1,020	1,512	0,897	0,958	0,968	0,925	0,601	1,440
Ca/P	1,119	1,145	1,115	1,151	1,186	1,105	1,056	0,917

Tabela 13. Wartości średnie uzyskane w wyniku mikroanalizy RTG – próbka 2.1**(grupa zapalenia przewlekłego)**

Pierwiastek	Średnia ze wszystkich pomiarów wt%	Średnia dla próby 2	Średnia dla próby 3	Średnia dla próby 5	Średnia dla próby 6
O	7,041	10,508	6,807	2,273	2,884
F	0,304	0,757	0,061	0,020	0,000
Na	1,454	1,180	2,658	0,040	0,322
Mg	0,893	0,957	1,193	0,180	0,693
P	29,819	38,177	36,402	5,080	14,637
S	7,252	8,397	8,880	3,325	3,444
K	0,567	0,607	0,916	0,039	0,000
Ca	26,527	26,126	34,893	1,058	36,850
Fe	2,223	1,837	3,379	0,339	2,350
Zn	65,883	69,146	BRAK DANYCH	84,464	36,381
Sr	0,398	0,200	0,598	0,324	0,501
Cd	2,341	1,378	4,212	0,491	1,939
Ca/P	0,890	0,684	0,959	0,208	2,518

Tabela 14. Wartości średnie uzyskane w wyniku mikroanalizy RTG – próbka 2.3**(grupa zapalenia przewlekłego)**

Pierwiastek	Średnia ze wszystkich pomiarów wt%	Średnia dla próby 4	Średnia dla próby 5	Średnia dla próby 7	Średnia dla próby 8
O	7,878	8,806	8,826	4,655	6,207
F	0,704	0,650	1,189	0,037	0,281
Na	1,444	1,870	2,058	0,499	0,099
Mg	0,958	0,795	1,058	0,998	1,048
P	39,686	44,782	44,755	20,439	31,519
S	10,905	10,863	12,108	12,035	8,306
K	0,298	0,410	0,377	0,052	0,087
Ca	21,776	21,769	21,823	2,342	31,425
Ti	7,127	BRAK DANYCH	BRAK DANYCH	12,327	4,527
Fe	3,565	4,741	3,767	1,539	2,165
Zn	22,655	bd	bd	42,327	12,818
Sr	0,869	0,857	0,505	1,860	1,034
Cd	2,983	4,457	3,535	0,892	0,484
Ca/P	0,549	0,486	0,488	0,115	0,997

Tabela 15. Wartości średnie uzyskane w wyniku mikroanalizy RTG – próbka 2.4**(grupa zapalenia przewlekłego)**

Pierwiastek	Średnia ze wszystkich pomiarów wt%	Średnia dla próby 6	Średnia dla próby 7	Średnia dla próby 9	Średnia dla próby 10
O	7,212	6,297	3,722	12,777	11,925
F	1,000	1,820	0,193	0,850	1,119
Na	1,478	1,689	1,784	0,989	0,764
Mg	1,093	1,383	1,030	0,778	0,879
P	42,242	46,435	48,794	33,012	26,398
S	13,164	13,909	13,576	15,923	7,705
K	0,761	0,682	1,267	0,388	0,134
Ca	23,538	21,924	24,531	16,266	32,260
Ti	1,329	BRAK DANYCH	BRAK DANYCH	1,148	1,510
Fe	3,099	3,310	2,916	2,467	3,666
Zn	12,534	BRAK DANYCH	BRAK DANYCH	13,225	11,842
Sr	0,408	0,501	0,491	0,352	0,053
Cd	1,846	2,050	1,695	1,824	1,743
Ca/P	0,557	0,472	0,503	0,493	1,222

Tabela 16. Wartości średnie uzyskane w wyniku mikroanalizy RTG – próbka 2.8
(grupa zapalenia przewlekłego)

Pierwiastek	Średnia ze wszystkich pomiarów wt%	Średnia dla próby 1	Średnia dla próby 2a	Średnia dla próby 2b
O	25,968	23,836	34,429	21,050
F	0,041	0,116	0,000	0,000
Na	1,189	1,001	1,827	0,846
Mg	0,744	0,474	0,843	0,931
P	21,288	27,706	17,135	18,331
S	1,469	0,835	3,534	0,383
K	0,132	0,062	0,357	0,015
Ca	33,247	45,082	24,958	28,319
Fe	1,425	0,381	3,584	0,671
Zn	25,988	BRAK DANYCH	50,697	1,278
Sr	0,491	0,031	1,386	0,205
Cd	10,948	0,479	1,806	29,037
Ca/P	1,562	1,627	1,457	1,545

Tabela 17. Wartości średnie uzyskane w wyniku mikroanalizy RTG – próbka 2.10**(grupa zapalenia przewlekłego)**

Pierwiastek	Średnia ze wszystkich pomiarów wt%	Średnia dla próby Korona1	Średnia dla próby Korona2	Średnia dla próby Korzen	Średnia dla próby Rdzen1	Średnia dla próby Rdzen2	Średnia dla próby Rdzen3
O	11,831	10,012	8,512	6,997	5,542	26,666	24,735
F	0,955	1,088	1,118	1,248	0,000	0,387	1,201
Na	2,450	2,624	1,785	2,308	1,330	3,144	4,078
Mg	1,311	1,182	0,804	1,680	0,718	1,984	1,304
P	31,920	34,455	34,955	34,705	28,837	24,007	26,203
S	2,195	2,097	2,214	1,992	2,143	2,056	3,062
K	0,701	0,000	0,325	1,092	1,174	0,481	1,201
Ca	39,971	40,827	42,575	39,483	51,379	34,936	29,131
Fe	5,650	5,812	6,395	6,684	3,354	4,889	4,444
Zn	BRAK DANYCH	BRAK DANYCH	BRAK DANYCH	BRAK DANYCH	BRAK DANYCH	BRAK DANYCH	BRAK DANYCH
Sr	0,294	0,195	0,122	0,133	0,730	0,414	0,620
Cd	2,722	1,710	1,192	3,679	4,794	1,037	4,023
Ca/P	1,252	1,185	1,218	1,138	1,782	1,455	1,112

LEGENDA DO FOTOGRAFII

Fot. 1. Tkanki okolicy okołowierzchołkowej w ostrym procesie zapalnym; obecne liczne komórki MPO-immunoreaktywne oraz włókna nerwowe PGP- immunoreaktywne (strzałki).

Fot. 2. Tkanki okolicy okołowierzchołkowej w ostrym procesie zapalnym; obecne pojedyncze komórki CD11c-immunoreaktywne (główki strzałek) oraz włókno nerwowe PGP-immunoreaktywne (strzałka).

Fot. 3. Uszkodzenie miazgi w okolicy okołowierzchołkowej (gwiazdka) w ostrym procesie zapalnym (barwienie HE).

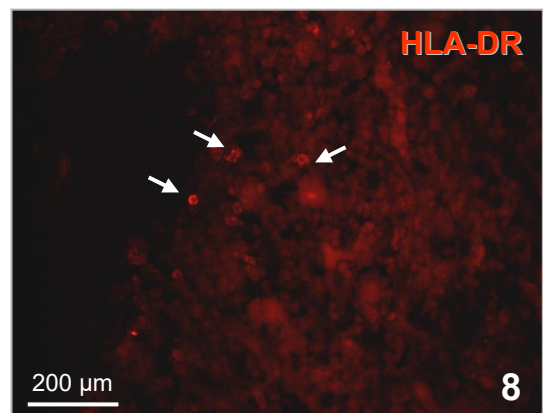
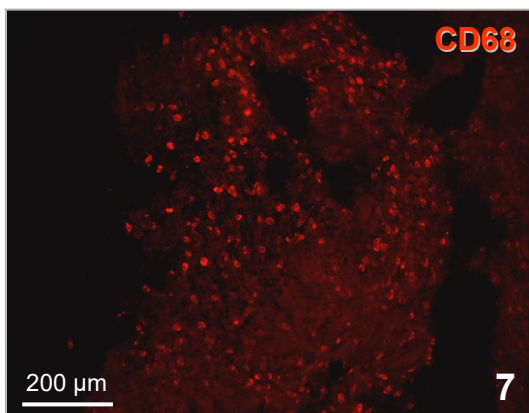
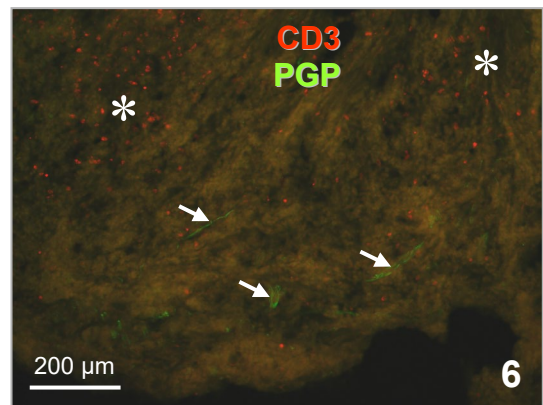
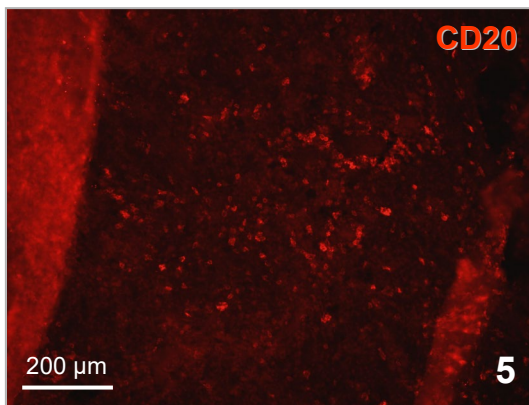
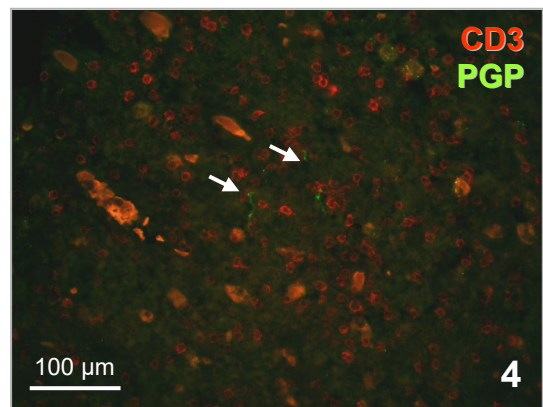
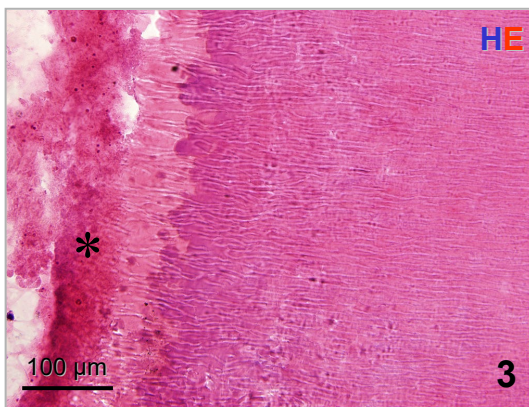
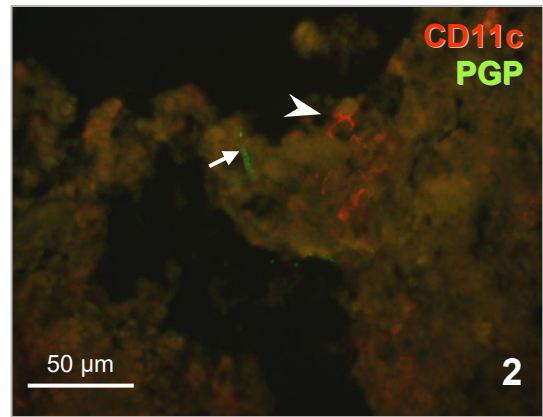
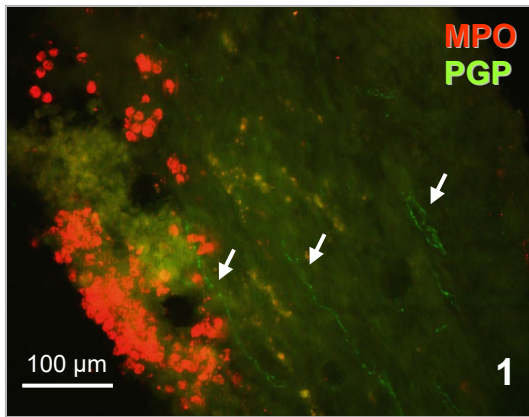
Fot. 4. Zmiana przewlekła; liczne komórki CD3-immunoreaktywne i włókna PGP-immunoreaktywne (strzałki).

Fot. 5. Zmiana przewlekła; liczne komórki CD20- immunoreaktywne zlokalizowane w centrum zmiany.

Fot. 6. Zmiana przewlekła; komórki CD8 - immunoreaktywne zlokalizowane w części obwodowej zmiany (gwiazdki), włókna i pęczki nerwowe w torebce (strzałki).

Fot. 7. Zmiana przewlekła; liczne komórki CD68- immunoreaktywne zlokalizowane w centrum zmiany.

Fot. 8. Zmiana przewlekła; nieliczne komórki HLA-DR- immunoreaktywne w centrum zmiany.



Fot. 9. Zmiana przewlekła; komórki CD8 - immunoreaktywne zlokalizowane w części obwodowej zmiany i pojedyncze włókno PGP- immunoreaktywne (strzałka).

Fot. 10. Zmiana przewlekła; nieliczne komórki CD8-immunoreaktywne (strzałki) zlokalizowane w części centralnej zmiany i włókna CGRP-immunoreaktywne (główki strzałek).

Fot. 11. Zmiana przewlekła; komórki CD20-immunoreaktywne (gwiazdka) w części centralnej zmiany i włókna PGP- immunoreaktywne (strzałki).

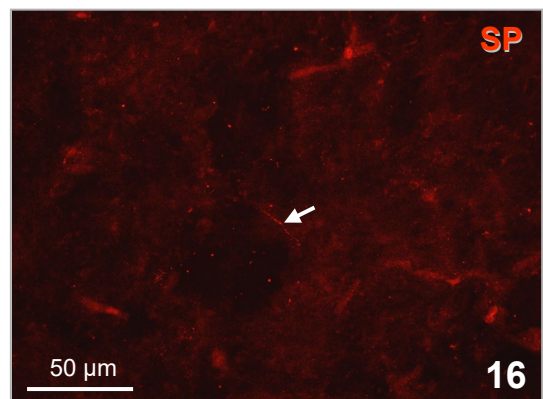
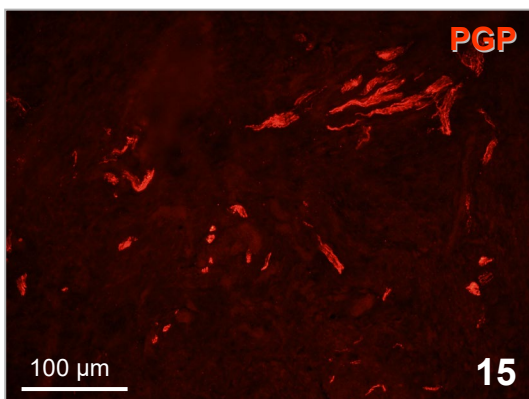
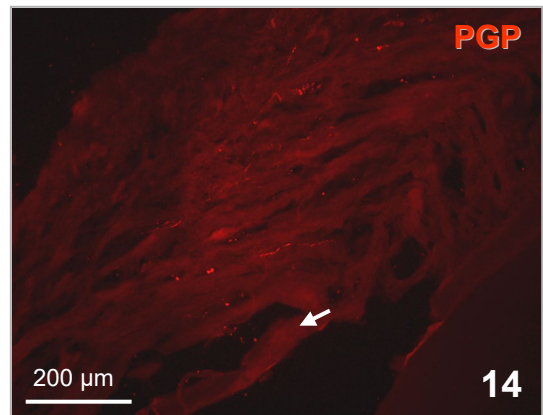
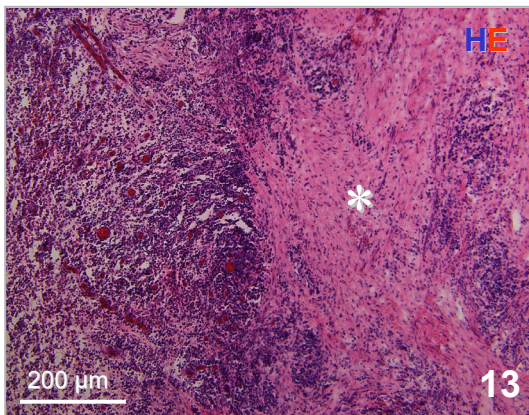
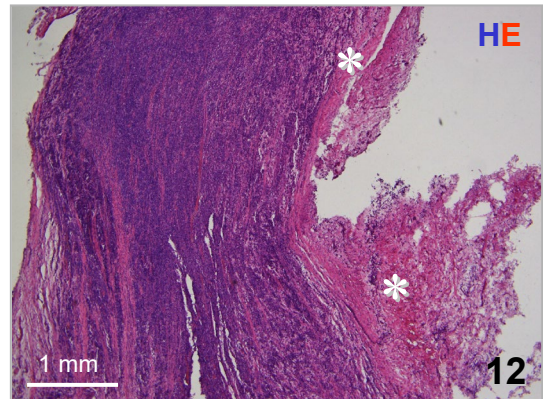
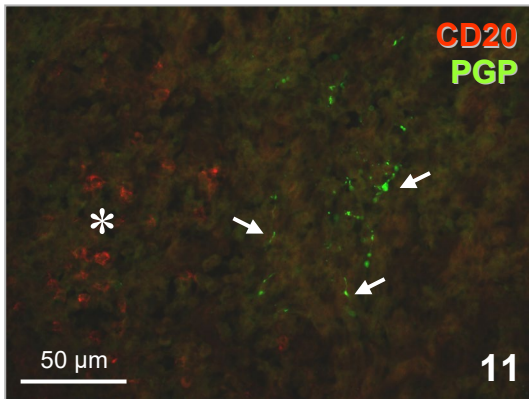
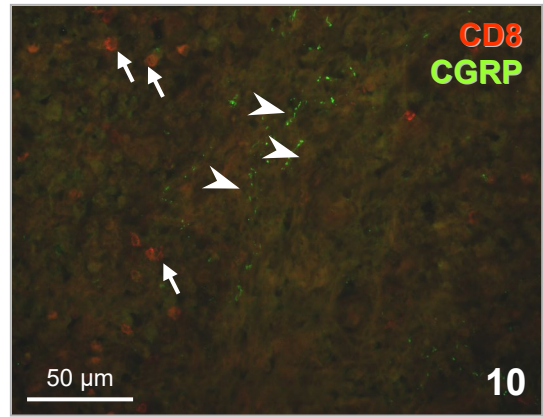
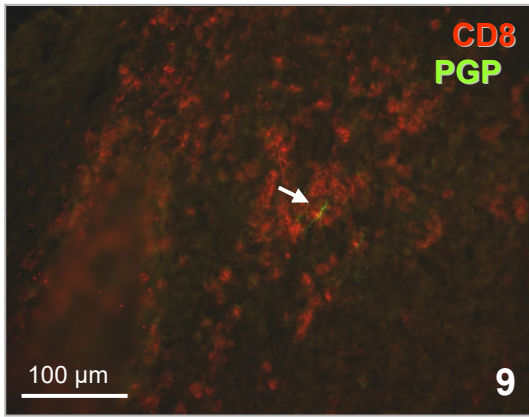
Fot. 12. Zmiana przewlekła z wyraźną torebką łącznotkankową (gwiazdki, barwienie HE).

Fot. 13. Zmiana przewlekła, zwłóknienie w centrum zmiany (gwiazdka, barwienie HE).

Fot. 14. Błona ozębna, grupa kontrolna, liczne włókna nerwowe PGP-immunoreaktywne pomiędzy pęczkami włókien kolagenowych więzadeł zęba okolicy okołowierzchołkowej.

Fot. 15. Błona ozębna, grupa kontrolna, liczne włókna i pęczki nerwowe PGP-immunoreaktywne okolicy okołowierzchołkowej w sąsiedztwie otworu wierzchołkowego

Fot. 16. Pojedyncze włókno SP-immunoreaktywne (strzałka) w ozębnej w sąsiedztwie otworu wierzchołkowego.



Fot. 17. Pojedyncze włókna i drobne pęczki CGRP-immunoreaktywne

Fot. 18. Splot włókien NPY-immunoreaktywnych wokół naczynia w ozębnej w sąsiedztwie otworu wierzchołkowego (przekrój podłużny).

Fot. 19. Splot włókien NPY-immunoreaktywnych wokół naczynia w ozębnej, w sąsiedztwie otworu wierzchołkowego (przekrój poprzeczny).

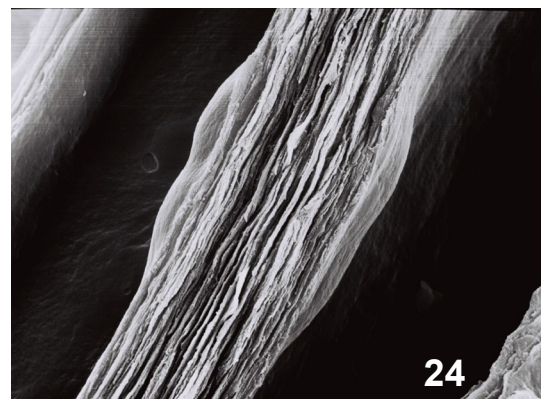
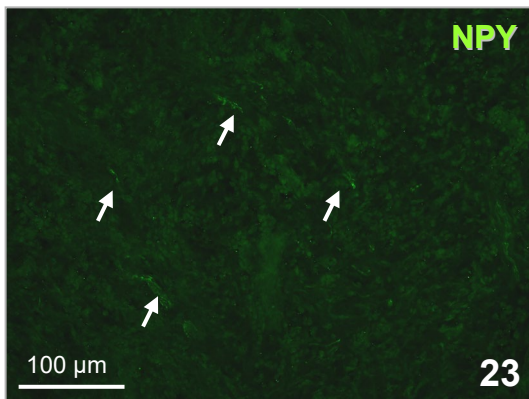
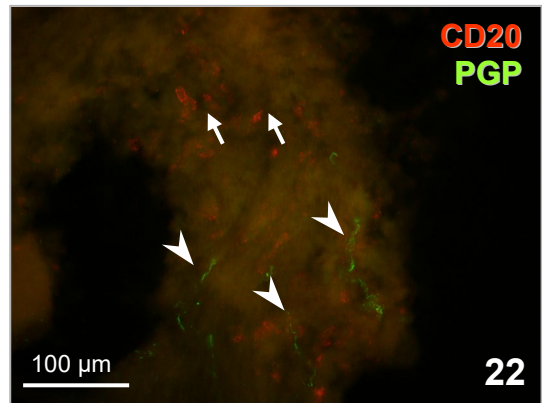
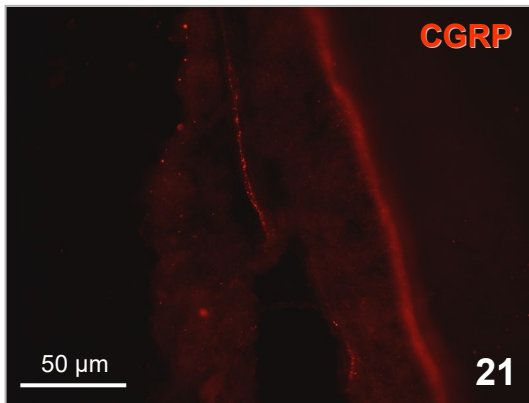
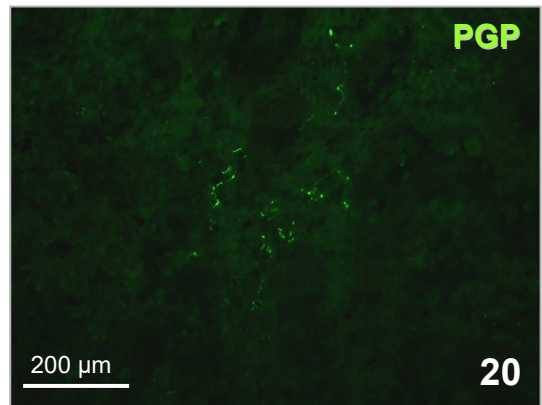
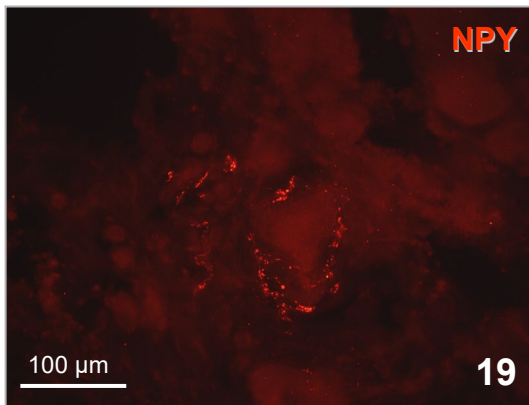
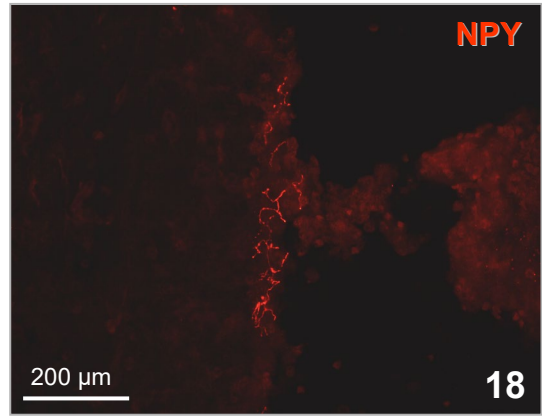
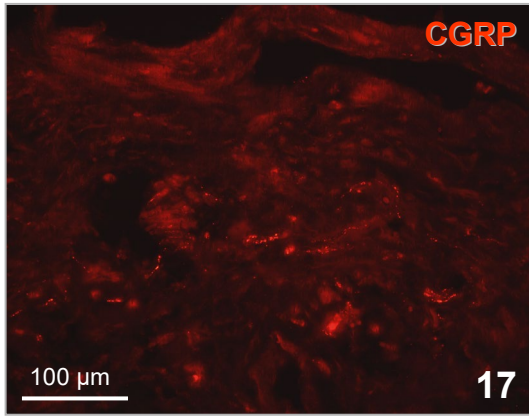
Fot. 20. Okolica okołowierzchołkowa zęba zajętego ostrym procesem zapalnym, obecność licznych włókien PGP-immunoreaktywnych.

Fot. 21. Włókno CGRP-immunoreaktywne w miazdze kanału korzeniowego blisko wierzchołka zęba zajętego ostrym procesem zapalnym

Fot. 22. Zmiana przewlekła; komórki CD20-immunoreaktywne (strzałki) i liczne włókna PGP- immunoreaktywne (główki strzałek).

Fot. 23. Zmiana przewlekła, obecne okołonaczyniowe włókna NPY-immunoreaktywne (strzałki).

Fot. 24. Widoczny pęczek włókien nerwowych w przekroju podłużnym z widocznym fragmentem limfocyta. Powiększenie 1800x



Fot. 25 Zdrowy ząb, wewnątrz kanału zęba z widocznymi otwartymi naczyniami krwionośnymi. Wewnątrz naczyń, w brzeżnej części widoczne uwypuklające się do jego światła jądra komórek śródbłonka. W obwodowej części naczyń, na zewnętrznej ścianie widoczne są fragmenty włókien mięsnych gładkich. Powiększenie 1080x

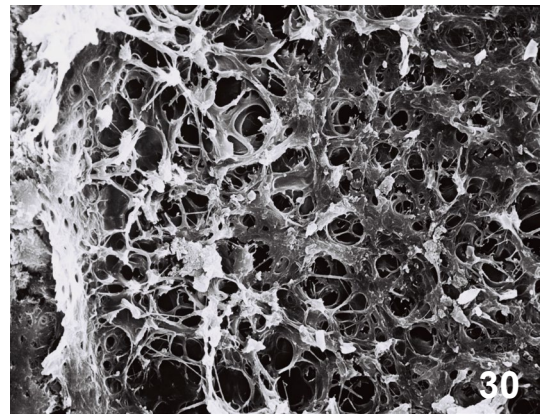
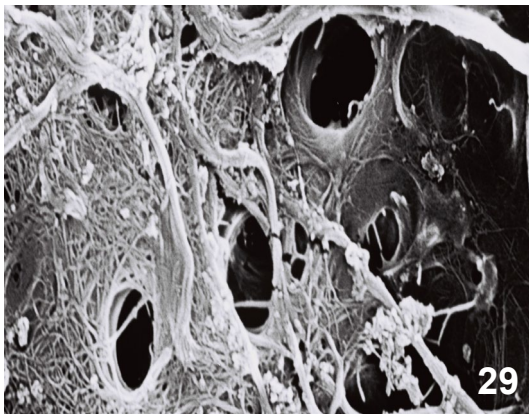
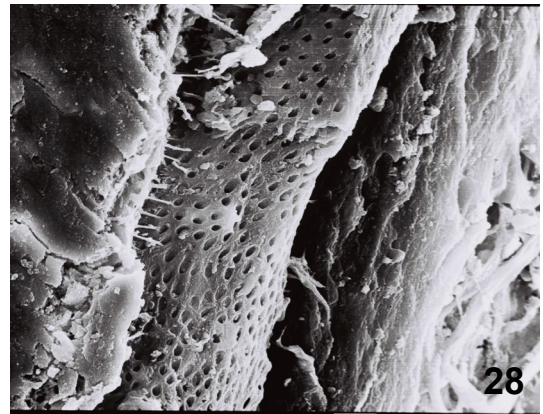
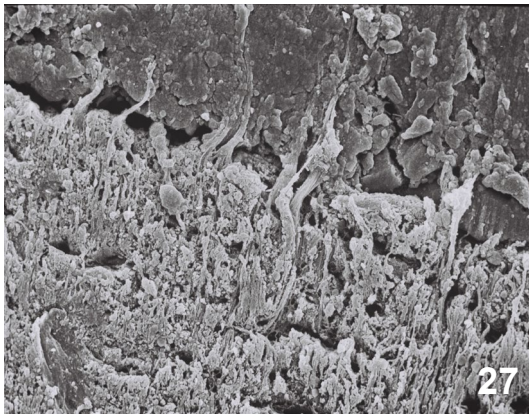
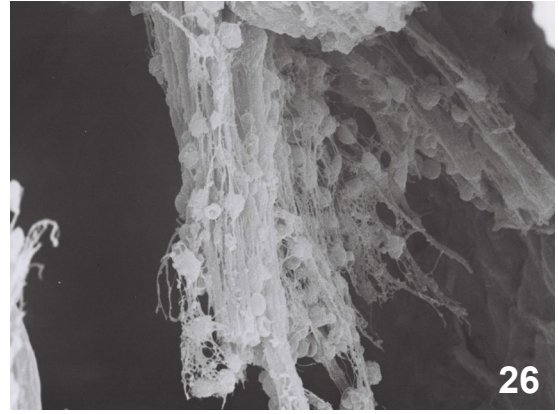
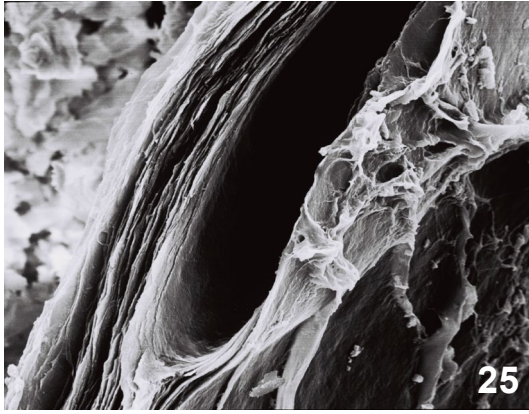
Fot. 26. Fragment miazgi zęba w przewlekłym procesie zapalnym z widocznymi komórkami miazgi i komórkami procesu zapalnego oraz wynaczynionymi krwinkami czerwonymi. Powiększenie 940x

Fot. 27. Wnętrze kanału zęba z widoczną miazgą i przębnią oraz przechodzącymi z miazgi zęba wypustkami odontoblastów w obręb kanalików przębiny w płaszczyźnie przekroju. Powiększenie 480x

Fot. 28. Widoczne wewnątrz kanału z otwartymi kanalikami poprzez które w różnych miejscach widoczne są wchodzące wypustki odontoblastów. Proces zapalny przebiega z zachowaniem macierzy przębiny, która zaciera obraz utkania włókien kolagenowych. Powiększenie 720x

Fot. 29. Włókna kolagenowe budujące strukturę przębiny ze szczególnym układem kolistym włókien budujących kanaliki zębiny. Proces zapalny ewidentnie zmniejsza ilość macierzy, co szczególnie uwidacznia układ włókien. Powiększenie 5400x

Fot. 30. Fragment miazgi zęba w przewlekłym procesie zapalnym z widocznymi komórkami miazgi i komórkami procesu zapalnego oraz wynaczynionymi krwinkami czerwonymi. Powiększenie 1130x



Piśmiennictwo

- (1) Krupiński, J. Biologia miazgi zębowej, przyzębia okołowierzchołkowego i brzeżnego (cz.II). *Kwartalny Niezbędnik Edukacyjno-Informatyczny dla Stomatologów* 05, 26-35. 2005.
- (2) Nair PN. Neural elements in dental pulp and dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;80(6):710-719.
- (3) Shimeno Y, Sugawara Y, Iikubo M et al. Sympathetic nerve fibers sprout into rat odontoblast layer, but not into dentinal tubules, in response to cavity preparation. *Neurosci Lett.* 2008;435(1):73-77.
- (4) Moe K, Kettunen P, Kvinnsland IH, Luukko K. Development of the pioneer sympathetic innervation into the dental pulp of the mouse mandibular first molar. *Arch Oral Biol.* 2008;53(9):865-873.
- (5) Wakisaka S, Itotagawa T, Youn SH et al. Distribution and possible origin of galanin-like immunoreactive nerve fibers in the mammalian dental pulp. *Regul Pept.* 1996;62(2-3):137-143.
- (6) Holland GR. Periapical neural changes after pulpectomy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;80(6):726-734.
- (7) Egan CA, Bishop MA, Hector MP. An immunohistochemical study of the pulpal nerve supply in primary human teeth: evidence for the innervation of deciduous dentine. *J Anat.* 1996;188 (Pt 3):623-631.
- (8) Hildebrand C, Fried K, Tuisku F, Johansson CS. Teeth and tooth nerves. *Prog Neurobiol.* 1995;45(3):165-222.
- (9) Bender IB. Pulpal pain diagnosis--a review. *J Endod.* 2000;26(3):175-179.
- (10) Olgart L. Neural control of pulpal blood flow. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996;7(2):159-171.
- (11) Byers MR. Dental sensory receptors. *Int Rev Neurobiol.* 1984;25:39-94.
- (12) Dong WK, Chudler EH, Martin RF. Physiological properties of intradental mechanoreceptors. *Brain Res.* 1985;334(2):389-395.
- (13) Dong WK, Shiwaku T, Kawakami Y, Chudler EH. Static and dynamic responses of periodontal ligament mechanoreceptors and intradental mechanoreceptors. *J Neurophysiol.* 1993;69(5):1567-1582.
- (14) Jyvasjarvi E, Kniffki KD. Cold stimulation of teeth: a comparison between the responses of cat intradental A delta and C fibres and human sensation. *J Physiol.* 1987;391:193-207.

- (15) White DM, Taiwo YO, Coderre TJ, Levine JD. Delayed activation of nociceptors: correlation with delayed pain sensations induced by sustained stimuli. *J Neurophysiol.* 1991;66(3):729-734.
- (16) Nishikawa S. Histochemistry of nerve fibres double labelled with anti-TRPV2 antibodies and sensory nerve marker AM1-43 in the dental pulp of rat molars. *Arch Oral Biol.* 2008;53(9):859-864.
- (17) Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23(4):183-191.
- (18) Biggs JE, Yates JM, Loescher AR et al. Changes in vanilloid receptor 1 (TRPV1) expression following lingual nerve injury. *Eur J Pain.* 2007;11(2):192-201.
- (19) Diogenes A, Akopian AN, Hargreaves KM. NGF up-regulates TRPA1: implications for orofacial pain. *J Dent Res.* 2007;86(6):550-555.
- (20) Caviedes-Bucheli J, Munoz HR, Azuero-Holguin MM, Ulate E. Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists. *J Endod.* 2008;34(7):773-788.
- (21) Edwall B, Gazelius B, Fazekas A et al. Neuropeptide Y (NPY) and sympathetic control of blood flow in oral mucosa and dental pulp in the cat. *Acta Physiol Scand.* 1985;125(2):253-264.
- (22) Edwall L, Kindlova M. The effect of sympathetic nerve stimulation on the rate of disappearance of tracers from various oral tissues. *Acta Odontol Scand.* 1971;29(4):387-400.
- (23) Kim S, Dorscher-Kim JE, Liu M. Microcirculation of the dental pulp and its autonomic control. *Proc Finn Dent Soc.* 1989;85(4-5):279-287.
- (24) Lundberg JM, Rudehill A, Sollevi A et al. Frequency- and reserpine-dependent chemical coding of sympathetic transmission: differential release of noradrenaline and neuropeptide Y from pig spleen. *Neurosci Lett.* 1986;63(1):96-100.
- (25) Pohto P, Antila R. Acetylcholinesterase and noradrenaline in the nerves of mammalian dental pulps. *Acta Odontol Scand.* 1968;26(6):641-656.
- (26) Pohto P, Antila R. Innervation of blood vessels in the dental pulp. *Int Dent J.* 1972;22(2):228-239.
- (27) Liu M, Kim S, Park DS et al. Comparison of the effects of intra-arterial and locally applied vasoactive agents on pulpal blood flow in dog canine teeth determined by laser Doppler velocimetry. *Arch Oral Biol.* 1990;35(5):405-410.

- (28) Okabe E, Todoki K, Ito H. Direct pharmacological action of vasoactive substances on pulpal blood flow: an analysis and critique. *J Endod.* 1989;15(10):473-477.
- (29) Casasco A, Calligaro A, Casasco M et al. Peptidergic nerves in human dental pulp. An immunocytochemical study. *Histochemistry.* 1990;95(2):115-121.
- (30) Luthman J, Luthman D, Hokfelt T. Occurrence and distribution of different neurochemical markers in the human dental pulp. *Arch Oral Biol.* 1992;37(3):193-208.
- (31) Olgart L, Gazelius B, Sundstrom F. Intradental nerve activity and jaw-opening reflex in response to mechanical deformation of cat teeth. *Acta Physiol Scand.* 1988;133(3):399-406.
- (32) Tang L, Chen Y, Wang Y et al. Peripheral nerve may regulate the jaw bone resorption after tooth extraction. *Med Hypotheses.* 2008;71(3):414-417.
- (33) Sessle BJ. Neurophysiology of orofacial pain. *Dent Clin North Am.* 1987;31(4):595-613.
- (34) Sigurdsson A, Maixner W. Effects of experimental and clinical noxious counterirritants on pain perception. *Pain.* 1994;57(3):265-275.
- (35) Hokfelt T, Broberger C, Xu ZQ et al. Neuropeptides--an overview. *Neuropharmacology.* 2000;39(8):1337-1356.
- (36) Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J.* 2003;36(7):464-471.
- (37) Berggreen E, Haug SR, Mkonyi LE, Bletsa A. Characterization of the dental lymphatic system and identification of cells immunopositive to specific lymphatic markers. *Eur J Oral Sci.* 2009;117(1):34-42.
- (38) Suzuki T, Kumamoto H, Kunimori K, Ooya K. Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors in lining epithelium of radicular cysts. *J Oral Pathol Med.* 2005;34(1):46-52.
- (39) Ihan HN, Ihan A. T lymphocyte activation and cytokine expression in periapical granulomas and radicular cysts. *Arch Oral Biol.* 2009;54(2):156-161.
- (40) Colic M, Lukic A, Vucevic D et al. Correlation between phenotypic characteristics of mononuclear cells isolated from human periapical lesions and their in vitro production of Th1 and Th2 cytokines. *Arch Oral Biol.* 2006;51(12):1120-1130.
- (41) Lukic A, Danilovic V, Petrovic R. [Comparative immunohistochemical and quantitative analysis of inflammatory cells in symptomatic and asymptomatic chronic periapical lesions]. *Vojnosanit Pregl.* 2008;65(6):435-440.

- (42) de Oliveira RC, Batista AC, Lara VS. Comparative immunohistochemical study of the presence of mast cells in apical granulomas and periapical cysts: possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97(1):59-63.
- (43) Santos LC, Ramos EA, Gurgel CA et al. Immunohistochemical detection of Langerhans cells in dental granulomas and radicular cysts. *J Mol Histol.* 2007;38(3):201-205.
- (44) Awawdeh L, Lundy FT, Shaw C et al. Quantitative analysis of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in pulp tissue from painful and healthy human teeth. *Int Endod J.* 2002;35(1):30-36.
- (45) Dourou V, Lyroudia K, Karayannopoulou G et al. Comparative evaluation of neural tissue antigens--neurofilament protein (NF), peripherin (PRP), S100B protein (S100B), neuron-specific enolase (NSE) and chromogranin-A (CgA)-- in both normal and inflamed human mature dental pulp. *Acta Histochem.* 2006;108(5):343-350.
- (46) Kimberly CL, Byers MR. Inflammation of rat molar pulp and periodontium causes increased calcitonin gene-related peptide and axonal sprouting. *Anat Rec.* 1988;222(3):289-300.
- (47) Rodd HD, Boissonade FM. Comparative immunohistochemical analysis of the peptidergic innervation of human primary and permanent tooth pulp. *Arch Oral Biol.* 2002;47(5):375-385.
- (48) Rodd HD, Boissonade FM. Immunocytochemical investigation of immune cells within human primary and permanent tooth pulp. *Int J Paediatr Dent.* 2006;16(1):2-9.
- (49) Tripi TR, Bonaccorso A, Rapisarda E, Bartoloni G. Proliferative activity in periapical lesions. *Aust Endod J.* 2003;29(1):31-33.
- (50) Byers MR, Taylor PE, Khayat BG, Kimberly CL. Effects of injury and inflammation on pulpal and periapical nerves. *J Endod.* 1990;16(2):78-84.
- (51) Uddman R, Kato J, Lindgren P et al. Expression of calcitonin gene-related peptide-1 receptor mRNA in human tooth pulp and trigeminal ganglion. *Arch Oral Biol.* 1999;44(1):1-6.
- (52) Killough SA, Lundy FT, Irwin CR. Substance P expression by human dental pulp fibroblasts: a potential role in neurogenic inflammation. *J Endod.* 2009;35(1):73-77.
- (53) Bowles WR, Withrow JC, Lepinski AM, Hargreaves KM. Tissue levels of immunoreactive substance P are increased in patients with irreversible pulpitis. *J Endod.* 2003;29(4):265-267.
- (54) Caviedes-Bucheli J, Lombana N, Azuero-Holguin MM, Munoz HR. Quantification of neuropeptides (calcitonin gene-related peptide, substance P,

- neurokinin A, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide) expressed in healthy and inflamed human dental pulp. *Int Endod J.* 2006;39(5):394-400.
- (55) Rodd HD, Boissonade FM. Substance P expression in human tooth pulp in relation to caries and pain experience. *Eur J Oral Sci.* 2000;108(6):467-474.
- (56) Fristad I, Vandevska-Radunovic V, Fjeld K et al. NK1, NK2, NK3 and CGRP1 receptors identified in rat oral soft tissues, and in bone and dental hard tissue cells. *Cell Tissue Res.* 2003;311(3):383-391.
- (57) Uddman R, Kato J, Cantera L, Edvinsson L. Localization of neuropeptide Y Y1 receptor mRNA in human tooth pulp. *Arch Oral Biol.* 1998;43(5):389-394.
- (58) Uddman R, Bjorlin G, Moller B, Sundler F. Occurrence of VIP nerves in mammalian dental pulps. *Acta Odontol Scand.* 1980;38(5):325-328.
- (59) Azuero-Holguin MM, Leal-Fernandez MC, Restrepo-Mejia LM et al. Identification and quantification of vasoactive intestinal peptide in periradicular lesions. *J Endod.* 2003;29(9):557-558.
- (60) Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci.* 1997;20(2):84-91.
- (61) Goslin K, Schreyer DJ, Skene JH, Banker G. Development of neuronal polarity: GAP-43 distinguishes axonal from dendritic growth cones. *Nature.* 1988;336(6200):672-674.
- (62) DeGraan PN, Hens JJ, Gispen WH. Presynaptic PKC substrate B-50 (GAP-43) and neurotransmitter release: studies with permeated synaptosomes. *Neurotoxicology.* 1994;15(1):41-47.
- (63) Kawasaki T, Nishio T, Kawaguchi S, Kurosawa H. Spatiotemporal distribution of GAP-43 in the developing rat spinal cord: a histological and quantitative immunofluorescence study. *Neurosci Res.* 2001;39(3):347-358.
- (64) Tetzlaff W, Zwiers H, Lederis K et al. Axonal transport and localization of B-50/GAP-43-like immunoreactivity in regenerating sciatic and facial nerves of the rat. *J Neurosci.* 1989;9(4):1303-1313.
- (65) Benowitz LI, Apostolides PJ, Perrone-Bizzozero N et al. Anatomical distribution of the growth-associated protein GAP-43/B-50 in the adult rat brain. *J Neurosci.* 1988;8(1):339-352.
- (66) Wilkinson KD, Lee KM, Deshpande S et al. The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science.* 1989;246(4930):670-673.
- (67) Thompson RJ, Doran JF, Jackson P et al. PGP 9.5--a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Res.* 1983;278(1-2):224-228.

- (68) Sisask G, Bjurholm A, Ahmed M, Kreicbergs A. Ontogeny of sensory nerves in the developing skeleton. *Anat Rec.* 1995;243(2):234-240.
- (69) Sisask G, Bjurholm A, Ahmed M, Kreicbergs A. The development of autonomic innervation in bone and joints of the rat. *J Auton Nerv Syst.* 1996;59(1-2):27-33.
- (70) Robertson A. and Nietzsche, S. Histomorphology and X-Ray Microanalysis of Reparative Dentin in Primary Teeth. *Microscopy and Microanalysis* 23(4) 2009.
- (71) Sabel N, Klinberg G, Nietzsche S et al. Analysis of some elements in primary enamel during postnatal mineralization. *Swed Dent J.* 2009;33(2):85-95.
- (72) Khayat BG, Byers MR, Taylor PE et al. Responses of nerve fibers to pulpal inflammation and periapical lesions in rat molars demonstrated by calcitonin gene-related peptide immunocytochemistry. *J Endod.* 1988;14(12):577-587.
- (73) Babal P, Soler P, Brozman M et al. In situ characterization of cells in periapical granuloma by monoclonal antibodies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1987;64(3):348-352.
- (74) Bergenholtz G, Lekholm U, Liljenberg B, Lindhe J. Morphometric analysis of chronic inflammatory periapical lesions in root-filled teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1983;55(3):295-301.
- (75) Gao Z, Mackenzie IC, Rittman BR et al. Immunocytochemical examination of immune cells in periapical granulomata and odontogenic cysts. *J Oral Pathol.* 1988;17(2):84-90.
- (76) Kontiainen S, Ranta H, Lautenschlager I. Cells infiltrating human periapical inflammatory lesions. *J Oral Pathol.* 1986;15(10):544-546.
- (77) Piattelli A, Artese L, Rosini S et al. Immune cells in periapical granuloma: morphological and immunohistochemical characterization. *J Endod.* 1991;17(1):26-29.
- (78) Stern MH, Dreizen S, Mackler BF, Levy BM. Isolation and characterization of inflammatory cells from the human periapical granuloma. *J Dent Res.* 1982;61(12):1408-1412.
- (79) Torabinejad M, Kettering JD. Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. *J Endod.* 1985;11(3):122-125.
- (80) Lukic A, Arsenijevic N, Vujanic G, Ramic Z. Quantitative analysis of the immunocompetent cells in periapical granuloma: correlation with the histological characteristics of the lesions. *J Endod.* 1990;16(3):119-122.
- (81) Marton IJ, Kiss C. Characterization of inflammatory cell infiltrate in dental periapical lesions. *Int Endod J.* 1993;26(2):131-136.

- (82) Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(2):179-200.
- (83) Toriya Y, Hashiguchi I, Maeda K. Immunohistochemical examination of the distribution of macrophages and CGRP-immunoreactive nerve fibers in induced rat periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 1997;13(1):6-12.
- (84) Feher E, Csanyi K, Vajda J. Ultrastructure and degeneration analysis of the nerve fibres of the tooth pulp in the cat. *Arch Oral Biol.* 1977;22(12):699-704.
- (85) Olgart L, Kostouros GD, Edwall L. Local actions of acetylcholine on vasomotor regulation in rat incisor pulp. *Acta Physiol Scand.* 1996;158(4):311-316.
- (86) Sasano T, Shoji N, Kuriwada S et al. Absence of parasympathetic vasodilatation in cat dental pulp. *J Dent Res.* 1995;74(10):1665-1670.
- (87) Haug SR, Heyeraas KJ. Modulation of dental inflammation by the sympathetic nervous system. *J Dent Res.* 2006;85(6):488-495.
- (88) Byers MR, Suzuki H, Maeda T. Dental neuroplasticity, neuro-pulpal interactions, and nerve regeneration. *Microsc Res Tech.* 2003;60(5):503-515.
- (89) Yamaguchi M, Ozawa Y, Mishima H et al. Substance P increases production of proinflammatory cytokines and formation of osteoclasts in dental pulp fibroblasts in patients with severe orthodontic root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;133(5):690-698.
- (90) Trantor IR, Messer HH, Birner R. The effects of neuropeptides (calcitonin gene-related peptide and substance P) on cultured human pulp cells. *J Dent Res.* 1995;74(4):1066-1071.
- (91) Caviedes-Bucheli J, Moreno GC, Lopez MP et al. Calcitonin gene-related peptide receptor expression in alternatively activated monocytes/macrophages during irreversible pulpitis. *J Endod.* 2008;34(8):945-949.
- (92) De Luigi A, Terreni L, Sironi M, De Simoni MG. The sympathetic nervous system tonically inhibits peripheral interleukin-1beta and interleukin-6 induction by central lipopolysaccharide. *Neuroscience.* 1998;83(4):1245-1250.
- (93) Kruszewska B, Felten SY, Moynihan JA. Alterations in cytokine and antibody production following chemical sympathectomy in two strains of mice. *J Immunol.* 1995;155(10):4613-4620.
- (94) Nagatomi R, Kaifu T, Okutsu M et al. Modulation of the immune system by the autonomic nervous system and its implication in immunological changes after training. *Exerc Immunol Rev.* 2000;6:54-74.
- (95) Haug SR, Heyeraas KJ. Effects of sympathectomy on experimentally induced pulpal inflammation and periapical lesions in rats. *Neuroscience.* 2003;120(3):827-836.