

UNIwersytet Jagielloński Collegium
Medicum

Wydział Lekarski

Barbara Obuchowicz

Neurosensoryczna kontrola mikrokrazenia w gojeniu
doświadczalnych owrzodzeń błony śluzowej jamy
ustnej

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. med. Wiesław W. Pawlik

Pracę wykonano w Katedrze Fizjologii UJ CM
Kierownik: Prof. dr hab. med. Wiesław W. Pawlik

KRAKÓW 2009

*Składam gorące podziękowania
Panu Profesorowi Wiesławowi W. Pawlikowi
za wyrozumiałość, okazaną życzliwość oraz cenne uwagi
przekazane w trakcie badań i pisania tej pracy.*

SKRÓTY ZASTOSOWANE W PRACY

AVO_2 - różnica tętniczo - żylna tlenu

CA – cyklaza adenylowa

DAG – diacyloglicerol

IP_3 – trifosforan inozytolu

LDBF - mikrokrażeniowy przepływ krwi

PIP_2 – fosfatydylo inozytolo difosforan

PLC – fosfolipaza C

CGRP – peptyd pochodny genu kalcytoniny

SP – substancja P

V – receptor vipergiczny

α – adrenoreceptor alfa

NK_1 – receptor neurokininowy 1,

Na – noradrenalina

Ach – acetylocholina

GLC – glukoza

CGMP – cykliczny guanozynomonofosforan.

CAMP – cykliczny adenozynomonofosforan

gK^+ - przez błonowy prąd potasowy

gCa^{++} - przez błonowy prąd wapniowy,

NOS – synteza tlenku azotu

CGMP – cykliczny guanozynomonofosforan

BK – bradykinina

His – histamina

PGs - prostaglandyny

SPIS TREŚCI

1. Wstęp
 - 1.1. Unerwienie jamy ustnej
 - 1.2. Unaczynienie jamy ustnej
 - 1.3. Historia badań neurosensorycznej kontroli mikrokrażenia
 - 1.4. Fizjologia i znaczenie odruchu włókienkowego
 - 1.5. Czynniki aktywujące odpowiedź neurosensoryczną
 - 1.6. Charakterystyka neuromediatorów układu sensorycznego
 - 1.7. Patofizjologia owrzodzenia i mechanizmy gojenia błony śluzowej jamy ustnej
 - 1.8. Znaczenia przepływu krwi w mechanizmie gojenia owrzodzeń
2. Cel pracy
3. Materiał i metody
 - 3.1. Inne procedury i techniki eksperymentalne
 - 3.2. Zastosowane substancje farmakologiczne
 - 3.3. Procedury pomiarowe
 - 3.4. Pomiar przepływu mikrokrażeniowego w błonie śluzowej i podśluzowej policzka i języka
 - 3.5. Pomiar powierzchni uszkodzeń błony śluzowej i ocena histologicznego stopnia tych uszkodzeń
 - 3.6. Statystyka
 - 3.7. Grupy doświadczalne
4. Wyniki
5. Dyskusja
6. Wnioski
7. Streszczenie w języku polskim
8. Streszczenie w języku angielskim

9. Literatura

1. WSTĘP

Uszkodzenia błony śluzowej jamy ustnej przyjmujące postać owrzodzeń stanowią częsty problem kliniczny. W etiopatogenezie owrzodzeń jamy ustnej podobnie jak w dalszych odcinkach przewodu pokarmowego podkreśla się znaczenie zachwiania równowagi pomiędzy mechanizmami zabezpieczającymi integralność komórek błony śluzowej i warstwy podśluzowej a polietiologicznymi czynnikami uszkodzającymi. Uszkodzenia błony śluzowej i podśluzowej jamy ustnej powstawać mogą na skutek osłabienia bariery śluzówkowej na tle chorób podstawowych, w przebiegu których dochodzi do zaburzenia odżywiania i odnowy tkanek – stany takie spotkać można w cukrzycy (175). Ponadto zapalenie i następne owrzodzenie błony śluzowej jamy ustnej stanowi manifestację uogólnionych chorób o podłożu immunologicznym takich, jak np. zespół Sjogrena (128), toczeń rumieniowaty (208), pęcherzyca, zespół Behceta (129). Najnowsze spostrzeżenia dowodzą, że upośledzenie odnowy oraz uszkodzenia błony śluzowej jamy ustnej występują w chorobach przebiegających z zaburzeniami żołądkowo-jelitowymi takich jak np. choroba Crohna, celiakia, zespoły złego wchłaniania, niedokrwistość złośliwa (32, 209, 215). Z owrzodzeniami spotykamy się również w zaburzeniach hematologicznych takich jak niedobór żelaza, kwasu foliowego lub witaminy C i B12. Przyjmuje się także, że owrzodzenia jamy ustnej, niekiedy mocno nasilone stanowią stałą komponentę procesów o charakterze nowotworowym przebiegających w obrębie układu krwiotwórczego takich jak niedokrwistość aplastyczna, białaczki, chłoniaki, zespół Chediaka-Higashiego, zespół

mielodysplastyczny, przewlekła granulomatoza, neutropenia (32, 103, 129, 136). Stany zapalne błony śluzowej z następowym jej uszkodzeniem w postaci owrzodzeń obserwuje się także w przebiegu przewlekłej niewydolności nerek, kiedy dochodzi do znacznego wzrostu poziomu mocznika w osoczu i ślinie (179). Czynniki jatrogenne, jak powtarzane, systematyczne narażenie na promieniowanie jonizujące w przebiegu radioterapii czy immunosupresja stosowana podczas leczenia chorób nowotworowych prowadzą do zwłóknień w obrębie tkanek miękkich, co ogranicza przepływ krwi i podaż składników odżywczych w obrębie tkanek, prowadząc ostatecznie do upośledzenia odnowy błony śluzowej jamy ustnej i powstawania uszkodzeń (38, 149). Częstą przyczyną występowania owrzodzeń jamy ustnej jest narażenie na bezpośrednie oddziaływanie dymu tytoniowego, w którym zawarta nikotyna prowadzi do przewlekłej aktywacji i patologicznych odpowiedzi unerwienia czuciowego oraz parasympatycznego błony śluzowej jamy ustnej (37). Nie można także zapominać, że częstą przyczyną powstawania owrzodzeń jamy ustnej jest lokalne działanie silnych czynników uszkadzających (chemicznych, fizycznych czy termicznych) związanych z ekspozycją na pokarm. Owrzodzenie błony śluzowej jamy ustnej stanowi poważny problem kliniczny z uwagi na znaczne unerwienie czuciowe tej okolicy, powodujące silne doznania bólowe, ograniczające często możliwość przyjmowania pokarmu, funkcje aparatu mowy czy uniemożliwiające utrzymywanie higieny jamy ustnej, co wtórnie prowadzi do nasilania się objawów a także przechodzenia stanu chorobowego na narząd zębowy. Dlatego niezwykle ważnym zagadnieniem jest poznanie czynników modyfikujących proces gojenia owrzodzeń błony śluzowej jamy ustnej, co daje nadzieję na przyspieszenie procesów naprawczych. Wydaje się, że podobnie jak w pozostałych odcinkach przewodu pokarmowego zasadnicze znaczenie dla podtrzymania żywotności tkanek w warunkach podstawowych oraz procesów naprawczych w okresie gojenia po

uprzednim uszkodzeniu tkanek jest właściwy przepływ krwi zapewniający odpowiednią podaż substratów energetycznych i tlenu oraz pozwalający odprowadzić produkty metabolizmu. W okresie trwania uszkodzenia krew jest ponadto źródłem komórek układu immunologicznego produkujących i uwalniających chemokiny, które odpowiadają za inicjację i podtrzymanie stanu zapalnego. Ponadto z krwią w miejsce uszkodzenia dostarczane są substraty macierzy komórkowej, które warunkują odbudowę uszkodzonych tkanek. Tkankowy przepływ krwi jest precyzyjnie regulowanym parametrem, zależnym od obecności i aktywności lokalnych i ogólnych mechanizmów kontroli, zwłaszcza neurogennej natury o szczególnym znaczeniu w błonie śluzowej ścian jamy ustnej. Poznanie ich udziału w rozwoju i przebiegu procesu gojenia otwiera możliwości pełniejszego zrozumienia tego mechanizmu, co stwarza nadzieję na skuteczniejsze oddziaływanie terapeutyczne w tym stanie.

1.1. UNERWIENIE JAMY USTNEJ

Błona śluzowa jamy ustnej posiada gęste unerwienie czuciowe odpowiadające za dośrodkową transmisję impulsów czuciowych, które także pełnią funkcje ochronne za pośrednictwem ultrakrótkich odruchów lokalnych (17, 42, 45, 66). Ponadto błona śluzowa jamy ustnej z uwagi na bogate ukrwienie otrzymuje liczne włókna nerwowe kontrolujące czynność naczyń krwionośnych, do których należą włókna układu sympatycznego i parasympatycznego oraz współczulne włókna okołonacyniowe. Nerwy parasympatyczne docierające w pobliże naczyń biorą udział w unerwieniu efektorycznym gruczołów wydzielniczych (3, 120, 180).

Pomimo, że unerwienie czuciowe błony śluzowej jamy ustnej pochodzi wyłącznie od nerwu trójdzielnego (56), towarzyszące mu komponenty układu autonomicznego oraz zmienna gęstość unerwienia sprawiają, że na tak małym obszarze jest ono bardzo zróżnicowane. Błona śluzowa pokrywa różne okolice jamy ustnej, które otrzymują unerwienie z odmiennych źródeł (obszary te przenikają się, a ich rozmieszczenie wykazuje różnice gatunkowe), co sprawia, że nie można jej traktować jako obszaru jednorodnie unerwionego (z unerwieniem z zakresu pojedynczego nerwu czaszkowego), lecz należy rozpatrywać poszczególne okolice z uwzględnieniem odmiennych źródeł unerwienia pochodzących z różnych nerwów czaszkowych (56, 120, 153). Wydaje się, że zróżnicowanie częstości występowania pewnych schorzeń zapalnych jamy ustnej w różnych jej obszarach odzwierciedla te naturalne odmienności morfologii oraz unerwienia. Z uwagi na różnice unerwienia błony śluzowej wyróżnić można obszar okolicy policzka, powierzchni zewnętrznej oraz wewnętrznej dziąseł, podniebienia twardego i miękkiego, wargi górnej i dolnej, oraz języka z uwzględnieniem różnic unerwienia dotyczących jego części grzbietowej (6, 212).

Błona śluzowa pokrywająca policzki otrzymuje unerwienie czuciowe z nerwu szczękowego (druga gałąź nerwu trójdzielnego) za pośrednictwem nerwu podoczodołowego oraz jego końcowych gałęzi zębodołowych górnych tylnych, zaopatrywana jest również przez nerw zuchwowy za pośrednictwem nerwu policzkowego, ponadto docierać tu mogą także końcowe gałązki nerwu twarzowego. Błona śluzowa tej okolicy otrzymuje również bogate unerwienie parasympatyczne, które zaopatruje nie tylko gruczoły wydzielnicze, ale także naczynia krwionośne. W przypadku okolicy policzków jest ono podwójne i obejmuje zarówno włókna pochodzące od zwoju skrzydłowo podniebiennego, jak i od zwoju usznego (49, 159, 174, 191).

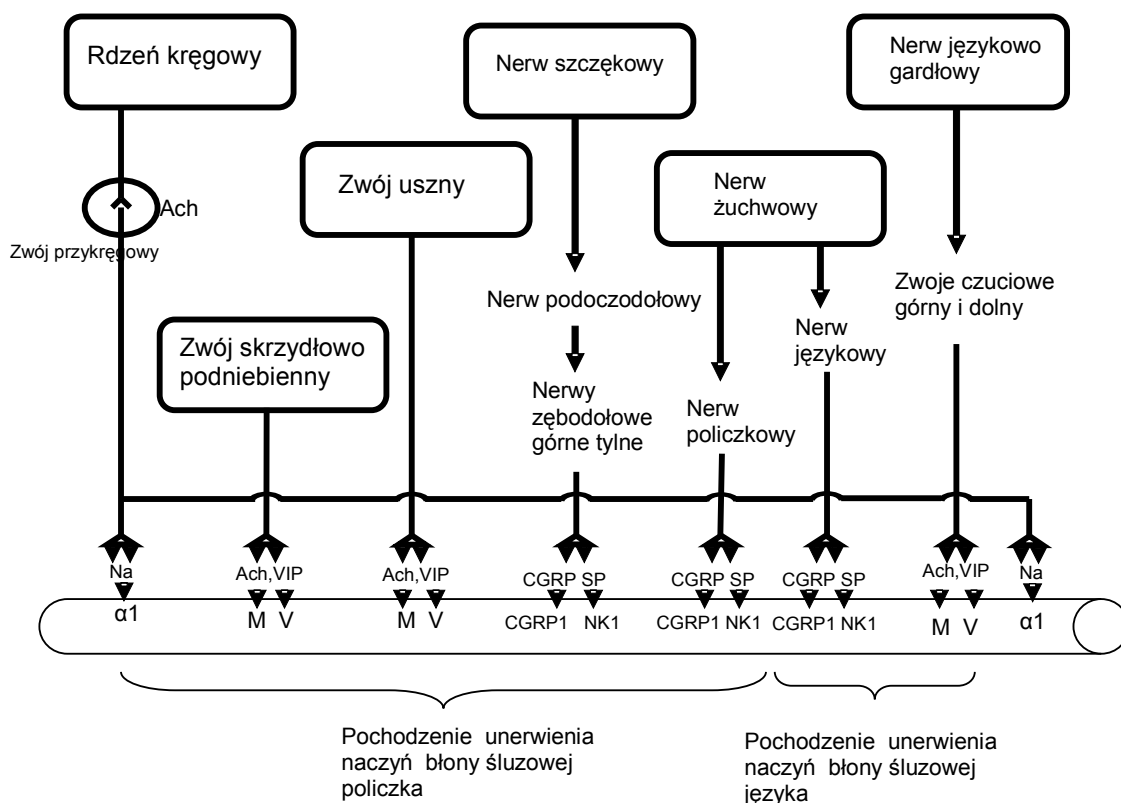
Naczynia krwionośne tej okolicy otrzymują unerwienie sympatyczne pochodzące z dwu źródeł: sympatycznych włókien okołonaczyniowych wywodzących się ze spłotów okołonaczyniowych dużych naczyń, takich jak tętnica szyjna zewnętrzna, oraz neuronów zazwojowych pochodzących ze zwoju szyjnego górnego, które łączą się na swoim przebiegu na poziomie zwoju trójdzielnego i docierają do okolicy naczyń krwionośnych, biegnąc wzdłuż nerwu podczodołowego i zębodołowego dolnego oraz ich gałęzi (11, 71, 143, 146). Naczynia błony śluzowej policzka otrzymują unerwienie z układu sympatycznego, którego włókna uwalniające jako główny mediator noradrenalinę wywołują efekty naczyniozężające (114, 164, 177, 188). Neurony parasympatyczne za pośrednictwem mediatorów, takich jak wazoaktywny peptyd jelitowy (posiadający dominujące znaczenie w obrębie jamy ustnej jako mediator naczyniorozszerzający) oraz acetylocholina powodują wzrost przepływu krwi w obrębie błony śluzowej (92, 93, 132).

Unerwienie czuciowe błony śluzowej wargi górnej jest podobne jak policzków, pochodzi od nerwu podczodołowego (przez gałąź wargową górną oraz gałęzie zębodołowe górne). Błona śluzowa wargi dolnej otrzymuje unerwienie za pośrednictwem nerwu żuchwowego, poprzez nerw zębodołowy dolny, który oddaje nerw bródkowy i gałęzie wargowe dolne. Okolice kątów ust zaopatruje nerw policzkowy. Włókna parasympatyczne docierające do tego obszaru, unerwiające naczynia i gruczoły pochodzą od zwoju usznego, natomiast unerwienie sympatyczne pochodzi od neuronów spłotów okołonaczyniowych (szczególnie w obrębie wargi górnej) (6, 120, 127, 152, 156, 212).

W zakresie unerwienia czuciowego język posiada niezwykle bogate unerwienie przewodzące impulsy z receptorów. Unerwienie czuciowe pochodzi przede wszystkim od nerwu żuchwowego, który za pośrednictwem nerwu językowego zaopatruje przednie

2/3 języka (a ponadto część błony śluzowej dna jamy ustnej). Pozostały obszar błony śluzowej języka zaopatrywany jest przez włókna pochodzące z nerwu językowo-gardłowego, które w okolicy błony śluzowej języka przewodzone są w obrębie zwojów czuciowych górnych i dolnych. Włókna pochodzące z nerwu twarzowego, ale przebiegające w obrębie nerwu językowego stanowią drogę dośrodkową bodźców czuciowych przewodzonych przez strunę bębenkową. Przewodzenie impulsów z receptorów smakowych brodawek grzybowatych odbywa się za pośrednictwem struny bębenkowej, która oddaje włókna przebiegające wzdłuż nerwu językowego oraz podjęzykowego, uczestniczącego w przewodzeniu wrażeń czuciowych odpowiednio z przedniej części języka oraz dna jamy ustnej. Impulsy z receptorów smakowych z brodawek okolonych i liściastych przewodzi nerw językowo-gardłowy (6, 212).

Z punktu widzenia specjalizacji czynnościowej najważniejszą funkcją struny bębenkowej jest przewodzenie impulsacji brodawek języka. Nerw ten zawiera ponadto komponentę parasympatyczną unerwienia do gruczołów języka. Unerwienie czuciowe podniebienia twardego oraz miękkiego nie różni się zasadniczo od unerwienia pozostałych obszarów błony śluzowej jamy ustnej (ryc.1).



Rycina 1. Przedstawia ogólny schemat unerwienia naczyń podśluzowych powierzchni ściany policzka oraz języka. Unerwienie parasympatyczne błony śluzowej policzka pochodzi ze zwoju skrzydłowo podniebiennego i zwoju usznego, natomiast nerw szczękowy i zuchwowy wiodą dośrodkowe bodźce czuciowe. Unerwienie adrenergiczne naczyń policzka oraz języka pochodzi z sympatycznych nerwów zazwojowych. Język zaopatrywany jest czuciowo przez nerw zuchwowy, nerw językowo gardłowy dostarcza impulsację z układu parasympatycznego. CGRP – peptyd pochodny genu kalcytoniny, SP – substancja P, Ach – acetylocholina, VIP – wazoaktywny peptyd jelitowy, Na – noradrenalina, M – receptor muskarynowy, V – receptor vipergiczny, α – adrenoreceptor alfa, CGRP₁ – receptor dla CGRP, NK₁ – receptor neurokininowy 1,

1.2. UNACZYNIENIE JAMY USTNEJ

Błona śluzowa jamy ustnej zaopatrywana jest w krew przez gałęzie tętnicy szyjnej zewnętrznej. Do naczyń tego regionu należą: tętnica policzkowa, twarzowa (gałęzie końcowe) i podoczodołowa zaopatrujące błonę śluzową policzka oraz tętnica językowa z jej gałęziami końcowymi, tętnicą głęboką języka i podjęzykową a także grzbietową języka zaopatrującymi język. Naczynia te na swoim przebiegu oddają liczne gałęzie, które łączą się między sobą wytwarzając gęstą sieć naczyniową w obrębie warstwy brodawkowatej. Z sieci tej biorą początek pętle naczyniowe sięgające ku warstwie podstawnej nabłonka. Cechą charakterystyczną odróżniającą unaczynienie kapilarne błony śluzowej od unaczynienia skóry jest występowanie bardzo gęstej sieci kapilarnej w obrębie brodawek błony śluzowej jamy ustnej. Arteriole policzka mają tu niezwykle kręty przebieg (w porównaniu z innymi tkankami), ponadto posiadają liczne rozgałęzienia, co zapewnia znacznego stopnia podatność na odkształcenia mechaniczne związane z narażeniem tkanek policzka na różne deformacje czynnościowe (np. znaczne rozciąganie przez pokarm). Przepływ krwi w błonie śluzowej jamy ustnej jest większy niż w skórze w warunkach temperatury komfortu cieplnego – zjawisko, które nie zostało do końca wyjaśnione, lecz najpewniej związane jest ze znacznym narażeniem błony śluzowej na uszkodzenia i koniecznością większej zdolności do regeneracji, co warunkowane jest przez większy przepływ krwi w warstwie podśluzowej. Największy przepływ w obrębie błony śluzowej jamy ustnej obserwuje się w tkance pokrywającej dziąsła. Odmiennością unaczynienia błony śluzowej w porównaniu z unaczynieniem skóry a zarazem cechą charakterystyczną jest występowanie licznych anastomoz tętniczo-żylnych obniżających opór przepływu w łożysku naczyń podśluzowych, co w

połączeniu z niskim oporem przepływu na poziomie arteriol odpowiada za znaczną wartość przepływu krwi w warunkach spoczynkowych. W przeciwieństwie do skóry, której unaczynienie ma znaczenie w regulacji temperatury, anastomozy błony śluzowej jamy ustnej nie biorą udziału w regulacji przepływu kapilarnego związanego z fenomenem termoregulacji a ich znaczenie wydaje się ograniczać do zwiększenia zdolności regeneracyjnych błony śluzowej jamy ustnej (150).

Mikrokrążenie jamy ustnej spełnia niezwykle istotne zadania, do których należy dostarczanie tlenu i glukozy do tkanek oraz odbieranie produktów metabolizmu a w szczególności dwutlenku węgla i kationów wodorowych. Wymiana ta może zachodzić dzięki specyficznej budowie niezwykle cienkiej ściany kapilar, składającej się jedynie z błony podstawnej i komórek śródbłonna, przez którą zachodzi nieustannie dyfuzja wody i gazów oddechowych zgodnie z ich gradientem chemicznym. Wymiana ta zależy przede wszystkim od liczby otwartych kapilar, im ilość ich jest większa tym większa jest powierzchnia aktywnej wymiany (parametr ten opisuje matematycznie współczynnik gęstości kapilarnej jako stosunek liczby kapilar otwartych do wszystkich kapilar w danej objętości tkanki). Wypełnienie łożyska kapilarnego przez krew zależy w pierwszej kolejności od czynności arteriol i zwieraczy prekapilarnych, które kontrolują napływ krwi z układu tętniczego wysokociśnieniowego do łożysk kapilarnych. Zwieracze prekapilarne znajdują się pod bardzo precyzyjną kontrolą zarówno lokalną jak i zdalną. Kontrola zdalna polega na dostosowaniu czynności zwieraczy do aktualnego stanu czynnościowego organizmu i jest reprezentowana przez włókna sympatyczne pozazwojowe, które za pośrednictwem mediatorów uwalnianych ze swoich zakończeń mają zdolność kurczenia miocytów gładkich ściany naczyniowej a tym samym zmniejszania światła naczyń. Zjawisko takie obserwować można w błonie śluzowej jamy ustnej w stanach wysiłku submaksymalnego czy reakcji centralizacji

krażenia, kiedy to dochodzi do redukcji przepływu przez błonę śluzową w jamy ustnej. Wpływy lokalne reprezentowane są przez czynniki hormonalne i humoralne, uwalniane bezpośrednio ze śródbłonka naczyniowego pod wpływem niedotlenienia, takie jak metabolity kwasu arachidonowego, z których najsilniejszym czynnikiem naczyniorozszerzającym w błonie śluzowej przewodu pokarmowego, w jamy ustnej jest prostaglandyna I₂ (prostacyklina). Niedotlenienie tkanek lub pobudzenie przez czynniki natury chemicznej czy mechanicznej powoduje ponadto aktywację lokalnych receptorów nerwowych, które stanowią zakończenia włókien czuciowych w tym cienkich włókien czuciowych typu C. Włókna te, jeśli zostaną pobudzone uwalniają neuropeptydy o działaniu pobudzającym na śródbłonek naczyniowy pod wpływem których aktywowana zostaje syntaza tlenu azotu (NOS) – izoforma śródbłonkowa, co prowadzi do powstania tlenu azotu – molekuly gazowej silnie rozszerzającej naczynia krwionośne a tym samym ułatwiającej napływ krwi tętniczej. Neurohormonem o poznanej działaniu naczyniorozszerzającym na drodze aktywacji NOS jest CGRP (peptydu pochodnego genu kalcytoniny). Aktywację neuronów czuciowych powodującą przekrwienie ścian jamy ustnej obserwować można po pobudzeniu włókien czuciowych przez czynniki chemiczne np. alkaloidy roślin z gatunku capsacium – widoczne jako „podrażnienie” błony śluzowej, czego głównym komponentem jest przekrwienie. Czynniki tkankowe uwalniane z komórek aktywowanych przez zmiany temperatury, niedotlenienie czy uraz, takie jak histamina, bradykinina czy kationy wodorowe wykazują także wpływ relaksujący na miocyty gładkie ścian naczyń powodując zwiększenie przepływu tkankowego oraz przepuszczalności naczyń śródbłonka, co ułatwia wymianę składników odżywczych, pozwalając przyspieszyć regenerację tkanek. Stan taki obserwować można w błonie śluzowej jamy ustnej w warunkach hipoksji (przekrwienie błony śluzowej jest jedną z

wczesnych oznak stanów zatrucia utrudniających podaż tlenu). Ukrwienie błony śluzowej jamy ustnej jest więc wynikiem precyzyjnej i niezwykle czułej regulacji, która z jednej strony jest wrażliwa na sygnały pochodzące z centralnego układu nerwowego, które powstają w różnych stanach organizmu, z drugiej zaś reaguje na sygnały lokalne, które odzwierciedlają potrzeby metaboliczne tkanki.

1.3. HISTORIA BADAŃ NEUROSENSORYCZNEJ KONTROLI MIKROKRAŻENIA

Pierwsze doniesienie na temat rozszerzenia naczyń będącego następstwem aktywacji neuronów sensorycznych autorstwa Goltza pochodzi z roku 1874. Obserwacje te, których mechanizmu wówczas nie umiano wyjaśnić, zostały potwierdzone przez Baylisa (7), który zauważył, że w warunkach stymulacji zwojów grzbietowych dochodzi do rozszerzenia naczyń obwodowych. Próby wyjaśnienia mechanizmu trójfazowej reakcji naczyniowej skóry na bodziec mechaniczny a zwłaszcza odległych efektów urazu miejscowego doprowadziły do sformułowania przez Lewisa w roku 1927 (126) pierwszej koncepcji odruchu włókienkowego. Odkrycie substancji P (SP) w roku 1931 przez Eulera i Gadduma (40), która wykazywała aktywność naczyniorozszerzającą i zwiększała przepuszczalność naczyń a jednocześnie

stanowiła produkt aktywowanych neuronów było znaczącym krokiem w kierunku odkrycia odruchu włókienkowego, czego najbliżej był Lembeck w roku 1953 (125), który udowodnił, że SP jest produkowana i uwalniana przez neurony czuciowe. Jednak dopiero badania Janco i Szolcosanyiego (99) przeprowadzone pod koniec lat sześćdziesiątych, którzy odkryli narzędzie farmakologiczne, jakim jest kapsaicyna, pozwalające na selektywną aktywację neuronów czuciowych otworzyły drogę do sformułowania teorii odruchu włókienkowego. Ponadto autorzy ci w toku swoich badań odkryli reakcję naczyniową polegającą na relaksacji naczyń i zwiększeniu ich przepuszczalności w odpowiedzi na stymulacje mediatorami neurogennymi, co określili jako zapalenie neurogenne - zjawisko o dużym znaczeniu zarówno fizjologicznym jak i patologicznym (61, 82, 84, 88, 161, 195, 196). Zrozumienie fizjologii włókien czuciowych i ich znaczenia w kontroli szerokości naczyń krwionośnych w odpowiedzi na stymulację neuronów czuciowych typu C wymagało poznania receptorów oraz mediatorów układu sensorycznego. Do najważniejszych etapów na tej drodze zaliczyć można odkrycie i opisanie znaczenia peptydu pochodnego genu kalcytoniny (CGRP) na początku lat osiemdziesiątych (2, 178, 180) oraz odkrycie i opisanie receptorów vanilloidowych dla kapsaicyny (VR1) w roku 1997 (24). Współczesne badania koncentrujące się wokół znaczenia włókien czuciowych typu C w różnych procesach patologicznych zależnych od zaburzeń przepływu krwi wskazują na ich kluczową rolę w mediacji tych zjawisk i tym samym otwierają drogę do opracowania skutecznych strategii postępowania leczniczego.

1.4. FIZJOLOGIA I ZNACZENIE ODRUCHU WŁÓKIENKOWEGO W BŁONIE ŚLUZOWEJ JAMY USTNEJ

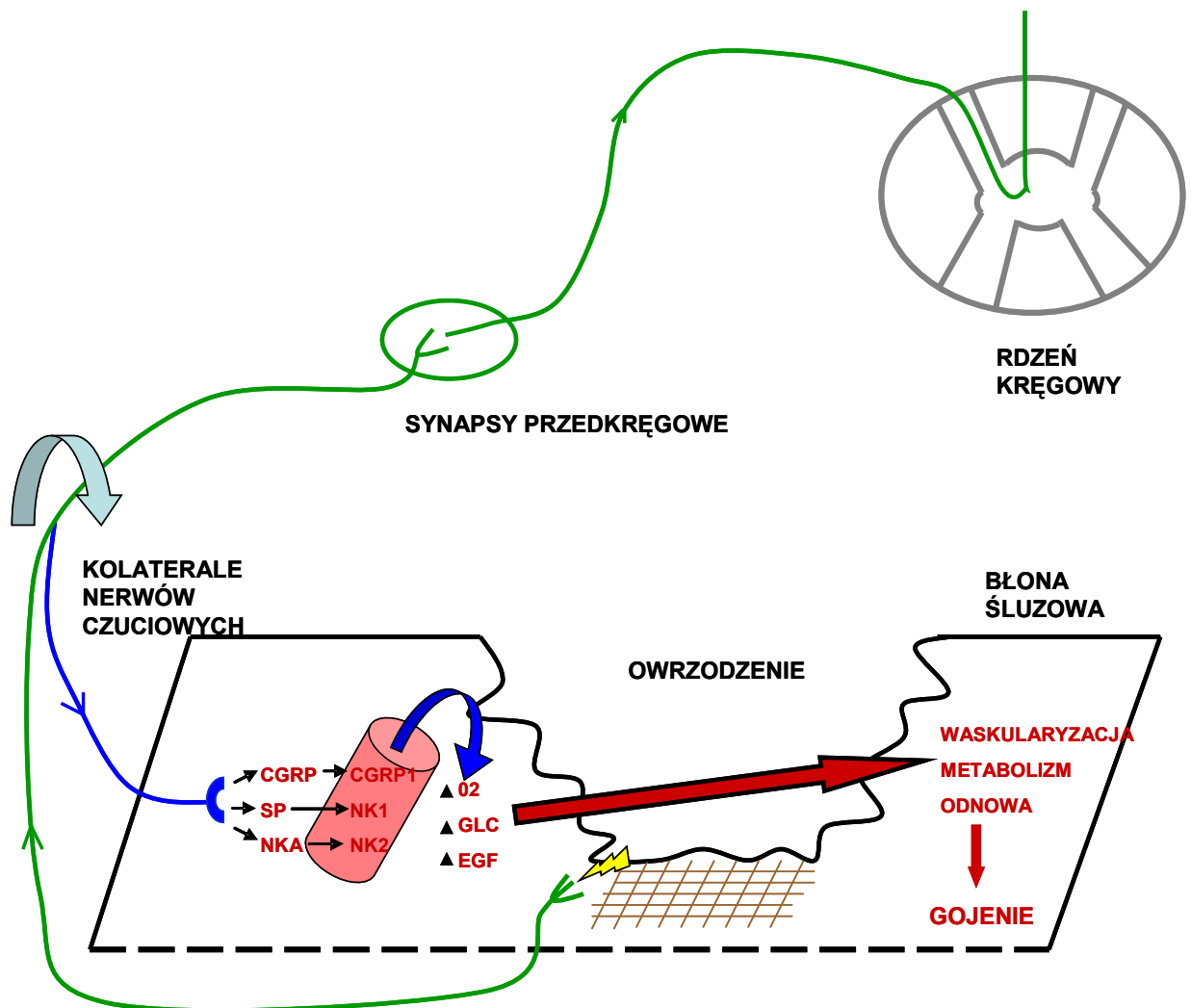
Regulacja funkcji naczyń błony śluzowej jamy ustnej przez włókna czuciowe odbywa się przy udziale tzw. odruchu włókienkowego (77, 78, 80, 85, 87, 119, 203). Jego podłoże morfologiczne stanowią czuciowe włókna niezmielinizowane lub posiadające bardzo cienką powłokę mielinową, nie przekraczającą średnicy 1,5 μm (dla włókien typu C), oraz 5 μm (dla cienko zmielinizowanych włókien Ab). Włókna te charakteryzują się bardzo wolnym przewodzeniem impulsów czuciowych (około 2,5 cm/sek). Neurony te są bardzo rozpowszechnione w okolicach ciała, które mają bezpośredni kontakt z otoczeniem lub substancjami pochodzenia egzogenego (pokarm) i w dużej mierze odpowiadają za unerwienie czuciowe poszczególnych obszarów jamy ustnej. Największe ich nagromadzenie spotyka się w obrębie skóry oraz błony śluzowej, gdzie ich rozgałęzione zakończenia pełnią rolę receptoryczną. Receptory takie z uwagi na rodzaj odbieranych bodźców można określać jako polimodalne, ponieważ są wrażliwe nie tylko na bodźce mechaniczne, ale także na termiczne czy osmotyczne (w przypadku błony śluzowej) (9, 44, 50, 119). Włókna czuciowe przewodzą informacje dośrodkowo za pośrednictwem rogów tylnych rdzenia. W przypadku jamy ustnej pierwsze neurony drogi czuciowej przebiegają w obrębie gałęzi nerwu trójdzielnego, docierają do zwoju Gassera, gdzie wytwarzają połączenie synaptyczne z neuronem przewodzącym informacje do wzgórza, w którym druga synapsa zlokalizowana jest w obrębie jądra brzuszno tylnio przyśrodkowego (VPM), skąd trzeci neuron dociera do kory mózgowej przedczołowej (w tym wieczka czołowo ciemieniowego), gdzie dochodzi do uświadamiania bodźców czuciowych (51, 112, 113,

134, 153, 214). Sam odruch włókienkowy funkcjonujący w ścianie jamy ustnej aktywowany jest na poziomie pierwszego neuronu. Charakterystyczną cechą nerwów funkcjonujących na tym poziomie tkankowym jest zdolność wysyłania informacji zwrotnej do okolicy warstwy podśluzowej, co realizowane jest przy udziale odgałęzień o charakterze wypustek określanych jako kolaterale (62, 161, 194, 196, 199). Zakończenia tych neuronów cechuje obecność poszerzonych odcinków określanych mianem żyłakowatości, z okolic których uwalniane są neuropeptydy (48, 84, 109, 133, 176). Niekiedy też informacja w postaci mediatorów peptyderygicznych wysyłana może być w obrębie włókien wstecznych pobudzanych w obrębie splotów nerwowych (brak jest jednoznacznych dowodów na poparcie takiej możliwości w jamie ustnej, natomiast mechanizm taki jest dobrze poznany w dalszych odcinkach przewodu pokarmowego np. ścianie żołądka czy jelita) (87, 115, 165). Informacja przewodzona wstecznie w obrębie pobudzonych neuronów sensorycznych prowadzi do aktywacji ich zakończeń, z których uwalniane są neuromediatory. Te molekuly sygnałowe z uwagi na swoją budowę (oligo i polipeptydową) określane są jako neuropeptydy. Działanie neuropeptydów polega na relaksacji naczyń krwionośnych, zwiększeniu ich przepuszczalności oraz działaniu aktywującym na gruczoły wydzielnicze. Aktywacja stanowi odpowiedź na działanie z zewnątrz silnego bodźca (faktycznie lub potencjalnie uszkadzającego), co pozwala na rozwinięcie reakcji obronnej tkanek, które dzięki lokalnemu przekrwieniu zdolne są skuteczniej bronić się przed następstwami uszkodzenia, co w pierwszej kolejności skutkuje przyspieszonym gojeniem tkanek (17, 22, 42, 45, 79, 86). Aktywacja gruczołów wydzielniczych w obrębie błony śluzowej jamy ustnej ma znaczenie w przypadkach chemicznej etiologii uszkodzeń, kiedy wydzielane wodorowęglany oraz woda zawarte w śluzie pozwalają ograniczyć rozległość uszkodzeń.

Badania ostatniej dekady pokazały, że aktywacja odruchu włókienkowego w obrębie błony śluzowej jamy ustnej ma znaczenie ochronne nie tylko w miejscu zadziałania bodźca, ale także prowadzi do przekrwienia tkanek okolicznych, co pozwala ograniczyć rozległość oddziaływania czynnika uszkodzającego. Sytuacja taka występuje, gdy dochodzi do pobudzenia neuronów czuciowych błony śluzowej przyzębia, co prowadzi nie tylko do lokalnego wzrostu przepływu, ale także indukuje zmiany w obrębie miazgi zęba, do których należą wzrost produkcji neuropeptydów oraz ich uwalniania, czemu towarzyszy zwiększenie przepływu (25, 26, 108, 176). Podobne zależności odkryto w przypadku stymulacji miazgi zęba, gdzie aktywacja neuronów czuciowych, oprócz impulsacji czuciowej w obrębie nerwów dośrodkowych wywoływała efekt naczyniorozszerzający w obrębie błony śluzowej przyzębia manifestujący się lokalnym wzrostem przepływu (67, 68, 148, 182). Zależności te wydają się mieć duże znaczenie w rozwoju i przebiegu chorób przyzębia, a ponadto mogą stać się obszarem docelowym farmakologicznego postępowania leczniczego. Odruch włókienkowy pomimo, że stanowi miejscową reakcję na bodziec i z uwagi na swój lokalny zakres jest zjawiskiem samoograniczającym się, które podlega kontroli układu autonomicznego. W obrębie tkanek miękkich jamy ustnej wykazano obecność czynnych receptorów α_1 , α_2 oraz Y_1 dla mediatorów adrenergicznych (odpowiednio noradrenaliny - NA i neuropeptydu Y - NPY), które ograniczają nie tylko uwalnianie, ale także powstawanie neuropeptydów (15, 69, 110). Możliwość wzajemnego oddziaływania neuronów sensorycznych i adrenergicznych na siebie może tłumaczyć ich bliskość (obie populacje lokalizują się wokół naczyń warstwy podśluzowej, w których ścianie zlokalizowane są swoiste receptory dla mediatorów obu układów) (3, 12, 155). Adrenergiczne wpływy hamujące na zakończenia efektoryczne układu sensorycznego mogą zostać przełamane w sytuacji aktywacji dużej liczby zakończeń

czuciowych przez powtarzające się lub działające na dużym obszarze bodźce o dużej sile lub w sytuacji oddziaływania swoistych czynników aktywujących neurony czuciowe (kapsaicyna). W stanach takich dochodzi do powstania tzw. zjawiska zapalenia neurogennego polegającego na reakcji naczyniowej o znacznej sile, która wywołuje cechy stanu zapalnego, w tym ocieplenie i obrzęk towarzyszące przekrwieniu z następową wtórną reakcją bólową (43, 64, 119, 203, 207, 211). Zapalenie neurogenne wykazuje potencjał naprawczy tkanek w przypadku aktywacji fizjologicznej, może być jednak stanem o charakterze uszkadzającym w sytuacji, gdy indukowany jest przez silnie oddziałujące czynniki aktywujące (kapsaicyna, resinferotoksyna) (17, 44, 203).

W obszarze jamy ustnej włókna czuciowe zaangażowane są w odruch naczyniorozszerzający, który oparty jest o działanie relaksujące włókien parasympatycznych, co spotykane jest wyłącznie w tym odcinku układu pokarmowego (160, 211). Pobudzenie włókien czuciowych przebiegających w obrębie gałęzi nerwu trójdzielnego aktywuje jądra układu parasympatycznego pnia mózgu, zwrotna odpowiedź aktywowanych włókien parasympatycznych wywołuje cholinergiczne rozszerzenie naczyń i wzrost przepływu. Bodźce z jąder układu parasympatycznego przewodzone są za pośrednictwem zwoju usznego oraz skrzydłowo podniebiennego przez neurony zaopatrujące okolice błony śluzowej ścian jamy ustnej (146, 160, 211). Mechanizm ten wydaje się być istotnym sposobem kontroli naczyń krwionośnych w obrębie jamy ustnej uzupełniającym działanie odruchu naczyniorozszerzającego, mediowanego przez kolaterale nerwów czuciowych w warunkach aktywacji przez bodźce uszkadzające tkankę jamy ustnej (ryc.2).



Rycina 2. Przedstawia podłoże morfologiczne oraz znaczenie fizjologiczne łuku odruchu włókienkowego. Pobudzenie zakończeń czuciowych w okolicy uszkodzenia (owrzodzenie) błony śluzowej jamy ustnej aktywuje włókna czuciowe, na skutek czego antydromowo przewodzone są impulsacje w obrębie kolateral tych włókien. Neuropeptydy uwalniane z ich zakończeń powodują poszerzenie światła naczyń krwionośnych. Następstwem zwiększonej podaży tlenu, substancji energetycznych i czynników wzrostu jest wzrost metabolizmu i przyspieszona odnowa tkanek wyrażona nasileniem procesów gojenia. Aktywność neuronów czuciowych na poziomie zwojów przedkręgowych podlega wpływom nerwowym ograniczającym ich aktywność. CGRP – peptyd pochodny genu kalcytoniny, SP – substancja P, NKA – neurokinina A CGRP₁ - receptor dla CGRP, NK₁, NK₂ – receptory neurokininowe, GLC – glukoza, EGF – nabłonkowy czynnik wzrostu.

1.5. CZYNNIKI AKTUWUJĄCE ODPOWIEDŹ NEUROSENSORYCZNĄ

Charakterystyczną cechą neuronów czuciowych jest odpowiedź na działanie kapsaicyny, której podanie lokalne wywołuje wzmożenie aktywności elektrycznej w tych neuronach oraz prowadzi do nasilonego uwalniania ich mediatorów - neuropeptydów. Zdolność cienkich, niezmielinizowanych neuronów C oraz słabo zmielinizowanych neuronów A delta do reakcji na kapsaicynę związana jest z obecnością na ich powierzchni swoistych receptorów określanych jako receptory vanilloidowe (24, 91, 194). Aktualnie opisanych zostało wiele podtypów receptorów kapsaicynowrażliwych, których wspólną cechą jest zdolność do otwierania drogi transbłonowej dla jonów w odpowiedzi na oddziaływanie kapsaicyny. Receptory kapsaicynowrażliwe tworzą rodzinę okresowo aktywowanych kanałów jonowych określanych jako TRPV (Transient Receptor Potential), które wykazują podobną budowę do innych receptorów sprzężonych z kanałami jonowymi (receptory przezbłonowe o sześciu przebijających błonę domenach) (14, 23, 24). Istotne jest, że kanały jonowe TRPV są aktywowane nie tylko przez swoiste czynniki takie jak kapsaicyna czy resinferotoksyna, ale także przez nieswoiste oddziaływania jak jony wodorowe, temperatura czy różnica stężeń jonów (gradient osmotyczny), co tłumaczyć może odpowiedź zapalną mediowaną przez neurony czuciowe na oddziaływania natury fizycznej (1, 89, 151). Pierwszym odkrytym, sklonowanym i najlepiej poznanym pozostaje receptor VR₁, dla którego określono nie tylko swoistych agonistów (wśród których obok kapsaicyny i resinferatoksyny znalazły się także piperyna i zigeron - składniki pieprzu, jak również valleal czy cinnamodial - aktywne składniki imbiru), ale także wiele swoistych antagonistów do których należą: kapsazepina czy czerwień

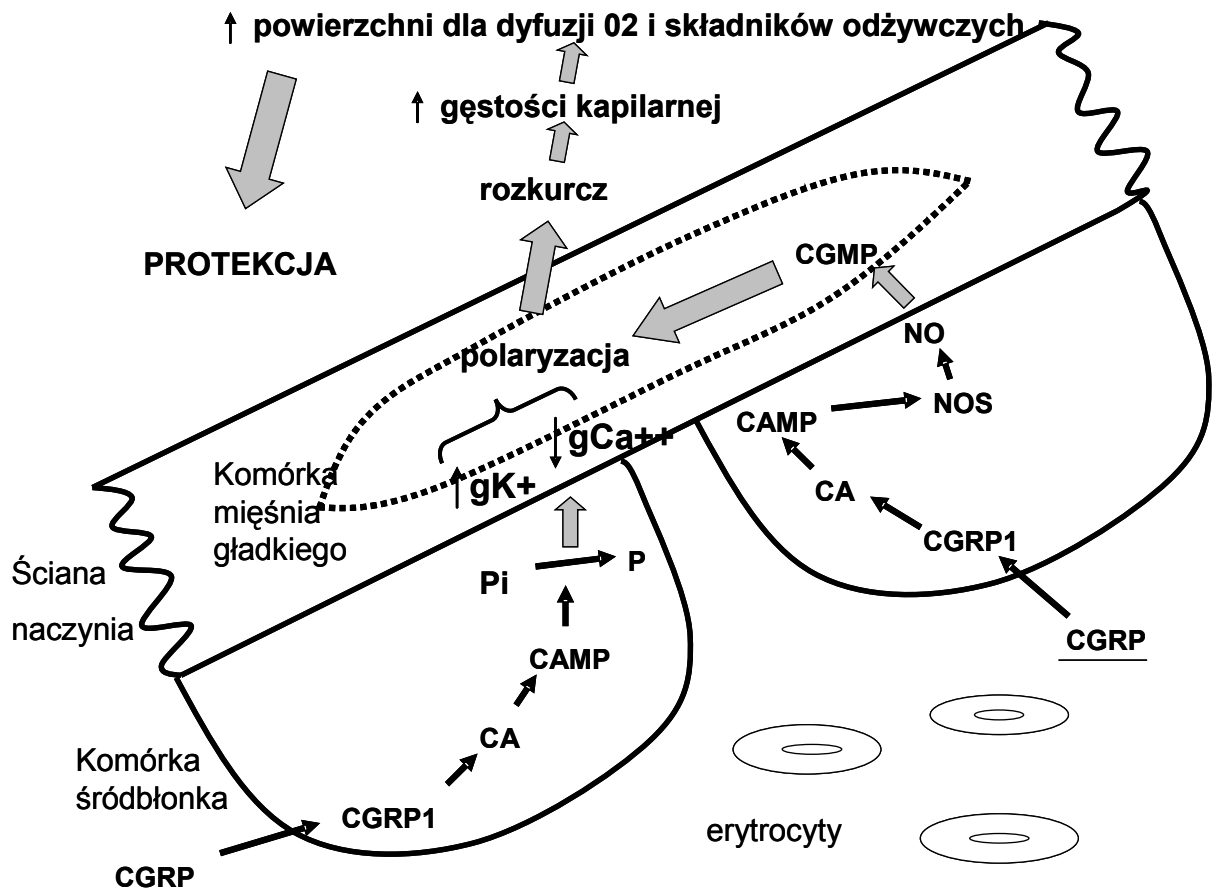
rutenu (16, 215). Obecność receptora VR₁ ściśle koreluje z immunoreaktywnością neuronów dla CGRP oraz SP, które są uwalniane wraz innymi mediatorami, takimi jak PACAP czy galanina w odpowiedzi na aktywację receptora VR₁. Oprócz lokalizacji na powierzchni cienkich, wolno przewodzących neuronów metodami immunohistochemii i elektrofizjologii wykazano obecność receptorów VR₁ w obrębie neuronów zwojów grzbietowych rdzenia kręgowego, gdzie ich rola polega na aktywacji neuronów czuciowych, modyfikacji czynnościowej drogi przewodzenia bólu oraz stymulacji produkcji i uwalniania niektórych neuropeptydów w tym SP (95). Drugą najważniejszą (poza neuronami śródściennymi ściany przewodu pokarmowego i skóry) lokalizacją receptorów typu TRPV są zwoje nerwu trójdzielnego i ich odgałęzienia (1, 89, 207). Uważa się, że obecne w tej lokalizacji receptory kapsaicyno - wrażliwe zdolne są indukować aktywność neuropochodnych procesów zapalnych, co niejednokrotnie zachodzi z dala od miejsca aktywacji neuronów przez czynniki drażniące. Wydaje się, że receptory TRPV a w szczególności receptory VR₁ są najważniejszymi aktywatorami włókien sensorycznych uczestniczących w kontroli naczyń błony śluzowej jamy ustnej.

1.6. CHARAKTERYSTYKA NEUROMEDIATORÓW UKŁADU SENSORYCZNEGO

Jak wspomniano wcześniej, w odpowiedzi na aktywację neuronów czuciowych uwalniane są liczne mediatory neuropeptydowe. Molekuły te powstają na skutek odcinania fragmentów oligopeptydowych z wielkich cząsteczek polipeptydów, co zachodzi w obrębie rybosomów zlokalizowanych na powierzchni szorstkich siateczek śródbłonkowych formujących końce CIS cystem Golgiego. Następnie w toku obróbki potranslacyjnej substancje te ulegają licznym modyfikacjom, w wyniku których uzyskują aktywność biologiczną (35). Tak uformowane molekuły sygnałowe zostają upakowane w tzw. dużych pęcherzykach wydzielniczych o tzw. gęstym rdzeniu. Bodźce o dużych amplitudach i długim czasie trwania powodujące dokomórkowy napływ wapnia prowadzą do uwolnienia neuropeptydów z zakończeń presynaptycznych. W toku badań nad zjawiskami indukowanymi przez pobudzenie neuronów czuciowych wykazano, że do mediatorów neurosensorycznych o najważniejszym znaczeniu zaliczyć można substancję P oraz CGRP. Neuropeptydy te uważane są za główne mediatory zapalenia powstającego na podłożu neurogennym. CGRP uważany jest za główny czynnik wywołujący rozkurcz miocytów gładkich ścian naczyń krwionośnych a tym samym rozszerzenie tych ostatnich, natomiast SP jest podstawowym mediatorem powodującym wzrost przepuszczalności ścian naczyń.

CGRP jest szeroko rozpowszechniony w układzie nerwowym, jednak największą ilość tego neuropeptydu spotyka się w obrębie włókien sensorycznych ściany przewodu pokarmowego, również w jamie ustnej. Substancja ta odkryta w roku 1982 jako alternatywny produkt transkrypcji genu dla kalcytoniny jest 37 aminokwasowym

polipeptydem wykazującym powinowactwo do receptora CGRP₁ oraz CGRP₂, przy czym receptor CGRP₁ jest szczególnie obecny w obrębie ścian naczyń oraz gruczołach. CGRP jest czynnikiem rozszerzającym naczynia krwionośne, który to efekt zależny jest zarówno od bezpośredniego oddziaływania na mięśnie gładkie ściany naczyniowej (52, 54, 62, 190, 193, 198, 215), ale także jest wywoływany przez naczyniorozszerzające mediatory produkowane przez śródbłonek naczyniowy, z których najważniejszym jest tlenek azotu (NO) (41, 104, 109, 111, 138, 199). W toku badań nad biologią i znaczeniem CGRP odkryto antagonistów CGRP, do których należą fragmenty oryginalnego 37 – aminokwasowego łańcucha (fragmenty zawierające sekwencje sygnałowe i będące selektywnymi blokerami kompetencyjnymi dla receptora CGRP₁), należą do nich CGRP₈₋₃₇ oraz CGRP₁₂₋₃₇ (8, 17, 47). Odkrycie znaczenia CGRP oraz antagonistów dla jego receptorów pozwoliło na dalszą analizę biologicznej roli tego peptydu, a także udziału w różnych procesach patologicznych takich jak zapalenie błony śluzowej powstającej w odpowiedzi na biologiczne, chemiczne oraz mechaniczne czynniki drażniące obecne w jamie ustnej (36, 37, 43, 107) (ryc.3).

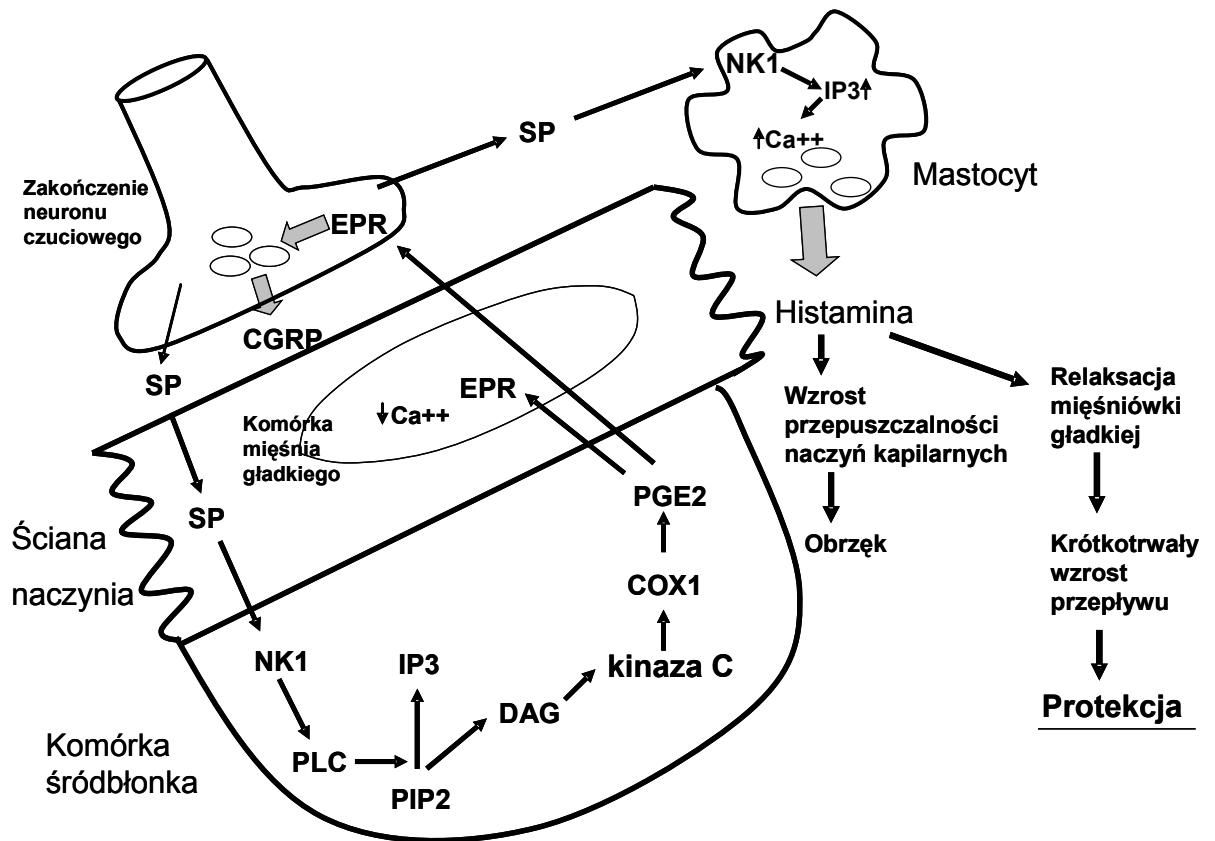


Rycina 3. Przedstawia mechanizm działania CGRP na ścianę naczynia krwionośnego. Zmiany przepuszczalności kanałów jonowych dla potasu oraz wapnia prowadzą do hyperpolaryzacji komórek mięśni gładkich ścian naczyń a tym samym ich rozkurczu, czego następstwem jest zwiększenie szerokości światła naczynia i wzrost przepływu. Istotne znaczenie odgrywa zwiększenie syntezy gazowego mediatora - tlenku azotu (NO), którego oddziaływanie także prowadzi do rozkurczu mięśni gładkich ścian naczyń i zwiększenia światła naczynia. Wzrost przepływu w obrębie oporowych naczyń krwionośnych powoduje nasilenie przepływu na poziomie sieci kapilarnych ze wzrostem liczby czynnych kapilar i czynnej powierzchni dla dyfuzji O₂. Zwiększona podaż tlenu jest bardzo istotna dla zjawiska protekcji.

CGRP – peptyd pochodny genu kalcytoniny, CGRP₁ – receptor dla CGRP, CA – cyklaza adenylova, CAMP – cykliczny adenozymonofosforan, gK⁺ - przezłonowy prąd potasowy, gCa⁺⁺ - przezłonowy prąd wapniowy, NOS – syntaza tlenku azotu, CGMP – cykliczny guanozymonofosforan.

Substancja P jest 11 aminokwasowym oligopeptydem odkrytym już w 1931 roku. Molekuła ta podobnie jak CGRP jest obecna w zakresie unerwienia przez neurony czuciowe, szczególnie w obrębie błony śluzowej wszystkich odcinków przewodu pokarmowego. Występuje również w obrębie zwojów przykręgowych układu sympatycznego oraz w mniejszej ilości w obrębie zwoju nerwu trójdzielnego (9, 133, 145, 206). W jamie ustnej immunoreaktywność dla SP odkryto w okolicy przyzębia, błony śluzowej podniebienia, dna jamy ustnej oraz w dnie kieszonki dziąsłowej (4, 65, 210). Jednym z istotnych efektów biologicznych substancji P jest jej wpływ na metabolizm tkanki kostnej (50). SP należy do rodziny tachykinin, do której zalicza się także neurokininę A, neurokininę B, jak również neuropeptydy K i delta. Tachykininy oddziałują na tkanki docelowe za pośrednictwem populacji receptorów neurokininowych, które są wspólne dla grupy tych mediatorów, ale wykazują zróżnicowane powinowactwo do receptorów neurokininowych. Substancja P wywiera efekty biologiczne za pośrednictwem receptorów neurokininowych (NK), przy czym jest swoistym agonistą względem receptora NK1, natomiast neurokininy NKA oraz NKB wywołują swoje efekty głównie za pośrednictwem receptorów NK2 oraz odpowiednio NK3 (76, 121, 124, 184, 186, 187, 192, 193). W układzie receptorowym neurokinin nie spotyka się zjawiska obligatoryjnej swoistości (poszczególne mediatory mają zdolność pobudzania wszystkich receptorów w tej grupie), co jest następstwem istnienia wspólnej pięciu aminokwasowej sekwencji w okolicy N końca łańcucha polipeptydowego, zdolnej oddziaływać na miejsca aktywne transmembranowych receptorów polipeptydowych. Pośród tachykinin SP wykazuje największą aktywność jako mediator stanu zapalnego i efekt ten związany jest ze zwiększaniem przepuszczalności naczyń kapilarnych. SP działa także naczyniorozszerzająco (synergistycznie z CGRP, wraz z którym jest najczęściej uwalniana) podobnie jak

CGRP stymuluje wydzielanie z gruczołów błony śluzowej jamy ustnej (4, 63, 65, 111, 131). Charakteryzując efekty neuropeptydów w tym CGRP oraz SP należy również wspomnieć o ich wpływie na układ immunologiczny, gdzie peptydy te wykazują działanie stymulujące na komórki układu immunologicznego, w tym neutrofile i makrofagi, które wykazują ekspresję zarówno receptorów CGRP₁ jak i NK (5, 70, 130, 170). Wydaje się, że to działanie neuropeptydów na układ immunologiczny jest jednym z mechanizmów aktywacji zapalenia i związanych z nim procesów naprawczych zachodzących nie tylko w następstwie przekrwienia danej okolicy i zwiększenia przepuszczalności tkanek, ale także na skutek bezpośredniej stymulacji komórek układu immunologicznego (ryc.4).



Rycina 4. Przedstawia molekularny mechanizm działania neuropeptydu – substancji P (SP). SP uwalniana z zakończeń włókien czuciowych oddziałuje za pośrednictwem swoistych receptorów neurokininowych NK_1 . Aktywacja receptora NK_1 powoduje wzrost syntezy prostaglandyny E (PGE_2), co na drodze obniżenia śródkomórkowego stężenia wapnia prowadzi do rozkurczu mięśni gładkich ścian naczyń. Ponadto aktywacja mastocytów i zwiększone uwalnianie histaminy powoduje wzrost przepuszczalności naczyń kapilarnych. Następowy obrzęk jest jedną z komponent neuropochodnego stanu zapalnego. Zwiększenie przepływu krwi, podaży składników odżywczych i tlenu na skutek zarówno pośredniego jak i bezpośredniego oddziaływania SP zwiększa zdolność tkanki do regeneracji a tym samym stanowi element zjawiska protekcji.

PLC – fosfolipaza C, PIP_2 – fosfatydylo inozytolo difosforan, IP_3 – trójfosforan inozytoli, DAG – diacyloglicerol, COX_1 – cyklooksygenaza1, PGE_2 – prostaglandyna E_2 , EPR – receptor dla metabolitów kwasu arachidonowego (prostaglandynowy).

1.7. PATOFIZJOLOGIA OWRZODZENIA I MECHANIZMY GOJENIA

BŁONY ŚLUZOWEJ JAMY USTNEJ

Owrzodzenie błony śluzowej jamy ustnej jest rodzajem penetrującego, powierzchniowego uszkodzenia tkanek, stanowi ubytek błony śluzowej i podśluzowej mogący obejmować błonę mięśniową. W obrębie owrzodzenia wyróżnić można dno – nekrotyczny obszar tkanek poddanych bezpośredniemu uszkodzeniu, brzeg owrzodzenia, który stanowi obszar przejściowy pomiędzy tkanką zdrową i zmienioną martwiczo oraz obszar tkanki zdrowej otaczającej owrzodzenie, która choć nie jest zmieniona morfologicznie podlega istotnym zmianom czynnościowym w okresie gojenia owrzodzenia.

Brzeg owrzodzenia jest obszarem, w którym zachodzą procesy naprawcze prowadzące do pokrycia tkanki martwiczej dna przez zregenerowaną błonę śluzową i podśluzową. Złożony proces gojenia z uwagi na chronologię zjawisk naprawczych podzielić można na trzy fazy: zapalenia, formowania nowej tkanki oraz jej przebudowy (29). W okresie zapalenia, w obszar tkanki nieuszkodzonej graniczącej z tkanką nekrotyczną docierają elementy morfotyczne krwi, w tym fibroblasty i płytki krwi zawierające w swych ziarnistościach peptydy zdolne stymulować wzrost i rozwój tkanek, z których najsilniejszy potencjał regeneracyjny wykazują polipeptydowe czynniki wzrostu – niezbędne w procesie odbudowy prawidłowo zróżnicowanych i unaczynionych tkanek. Do najważniejszych czynników stymulujących regenerację tkanek należą: płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), który stymuluje fibroblasty, pobudza produkcję kolagenu oraz angiogenezę, śródbłonkowy czynnik wzrostu (EGF) odpowiedzialny za wzrost nabłonka w okolicy uszkodzonej, fibroblastyczny czynnik wzrostu (FGF) o kompleksowym działaniu stymulującym na komórki śródbłonka,

fibroblasty i angiogenezę, ale także wywołujący powstanie macierzy pozakomórkowej oraz transformujący czynnik wzrostu (TGF) - czynnik chemotaktyczny pobudzający wzrost komórek mezenchymalnych nabłonka i śródbłonka (39, 142). Okres zapalenia charakteryzuje rozluźnienie mięśniówki gładkiej naczyń i następny wzrost przepływu oraz przepuszczalności naczyń, co pozwala na zwiększenie podaży tlenu i środków odżywczych w okolice gojenia, ale także umożliwia przenikanie komórek mezenchymalnych przez ściany naczyń. Procesy te zachodzą w obrębie nieuszkodzonych tkanek przyległych do obszaru uszkodzenia. Nagromadzenie odpowiedniej liczby komórek oraz macierzy pozakomórkowej (kolagenu oraz proteoglikanów) tworzących ziarninę, pozwala rozpocząć drugą fazę gojenia, którą stanowi odbudowa nowej tkanki. W tym okresie zjawiskiem kluczowym warunkującym powstanie prawidłowej, pełnowartościowej tkanki, mogącej służyć jako bariera dla czynników zewnętrznych jest angiogeneza (201). Proces angiogenezy zachodzi w obrębie uformowanej tkanki ziarninowej i rozpoczyna go proteoliza błony podstawnej, która pozwala wytworzyć kanał przepływu w obrębie przyszłego naczynia. Następnym etapem formowania naczynia jest tworzenie ściany naczyniowej, inicjowane przez wrastanie komórek śródbłonka (46). Etap ten wymaga aktywacji limfocytów, monocytów oraz fibroblastów i jest uzależniony od złożonych interakcji pomiędzy molekułami adhezyjnymi oraz elementami morfotycznymi krwi. Do najważniejszych molekuł należy cząsteczka naczyniowej adhezji powierzchniowej (VCAM₁) odpowiedzialna za indukcję proteaz pozwalających wytworzyć kanał naczyniowy oraz cząsteczka powierzchniowej adhezji śródbłonka (PECAM), stymulująca wzrost śródbłonka oraz aktywująca ekspresję integryn niezbędnych do wytworzenia połączeń międzykomórkowych typu złącz ścisłych, co ostatecznie przekształca warstwę nowopowstałych komórek śródbłonka i macierzy podstawnej w pełnowartościową

blonę wewnętrzną naczyń (139, 147, 185). Rozwój naczyń jest zjawiskiem kluczowym dla odbudowy tkanek, gdyż jedynie dobrze unaczyniona ziarnina, w której zapewniona jest podaż tlenu, substancji odżywczych i czynników wzrostu może wytworzyć pełnowartościową tkankę podstawną, do czego niezbędna jest aktywacja fibroblastów i dalsza synteza kolagenu. Wytworzona tkanka podstawna zawierająca kolagen, macierz proteoglikanową oraz sieć fibroblastów i naczyń wypełnia obszar uszkodzenia. Ostatnią fazą naprawy jest przekształcenie tkanki (remodeling), w czasie którego zachodzą skomplikowane procesy nawiązywania połączeń międzybłonowych i formowania przestrzennego układu ukształtowanych elementów komórkowych w obrębie odnawiającej się tkanki (183). Wśród licznych zjawisk zachodzących w tym okresie do najważniejszych należy odbudowa bariery nabłonkowej pokrywającej obszar nowopowstałej tkanki. W procesie tym na etapie indukcji i migracji komórek nabłonka główną rolę odgrywają kadheryny, natomiast na etapie budowy złącz ścisłych między komórkami śródbłonka z podłożem kluczowe znaczenie wykazują cząsteczki z grupy integryn (integryny alfa 2 oraz alfa 3), które stanowią receptory dla kolagenu i lamininy (147). Wytworzenie pełnowartościowych naczyń oraz odtworzenie nabłonka pozwala na pełną odbudowę obszaru uszkodzenia przez pokrycie tkanki martwiczej zróżnicowaną tkanką prawidłową. Proces ten oparty na licznych zależnościach o typie sprzężeń zwrotnych, jeśli zostanie zapoczątkowany i pobudzony przez czynniki wzrostu wykazuje dużą autonomię. Jest on zależny w znacznym stopniu od utrzymania prawidłowego przepływu krwi w miejscu uszkodzenia, który zapewnia podaż wszystkich komórkowych i poza morfotycznych czynników oraz ewakuację metabolitów. Z tego powodu uważa się, że ukrwienie strefy gojenia ma znaczenie decydujące dla procesów naprawy (19, 20, 45, 85, 87, 115, 117, 137, 213).

1.8. ZNACZENIE PRZEPIYU KRWI W MECHANIZMIE GOJENIA OWRZODZEŃ

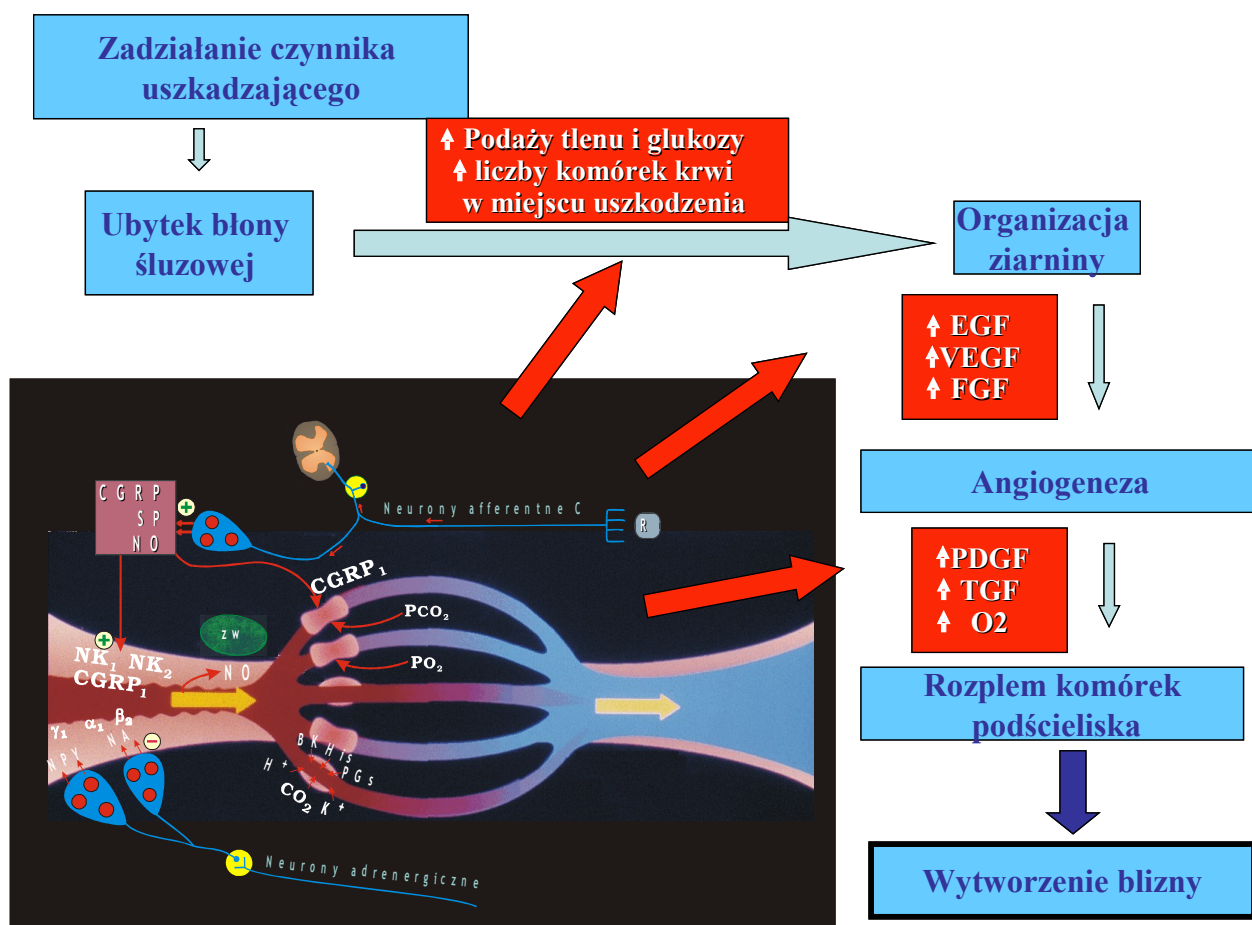
W świetle współczesnej wiedzy wydaje się, że głównym czynnikiem umożliwiającym regenerację błony śluzowej jamy ustnej obok czynników wzrostu i molekuł adhezyjnych uwalnianych w okolicy uszkodzenia przez komórki jest podaż tlenu i składników odżywczych z krwią (97, 162, 163, 168). Zapotrzebowanie energetyczne uszkodzonych i regenerujących się tkanek jest bardzo duże z uwagi na nasilone procesy podziałów komórkowych i różnicowania (22, 29, 117, 200). Zapotrzebowanie to pokrywa układ naczyniowy, który zdolny jest dostarczyć w miejsce uszkodzenia większą ilość krwi, w wyniku rozszerzenia naczyń doprowadzających krew do obszaru mikrokążenia (arteriol), co jest następstwem rozkurczu mięśniówki gładkiej ściany naczynia, na skutek czego dochodzi do zwiększenia całkowitego przepływu krwi w jednostkach mikrokążenia (62, 87, 97). Wzrost całkowitego przepływu przez układ naczyniowy w danej objętości tkanki, chociaż niezbędny, nie jest wystarczający dla pokrycia zwiększonego zapotrzebowania energetycznego tkanek. Niezbędny jest w tym przypadku wzrost powierzchni wymiany tlenu oraz składników odżywczych, który następuje dzięki zwiększeniu liczby aktywnych kapilar w obrębie danej objętości tkanki. Parametr gęstości kapilarnej (stosunek całkowitej liczby kapilar do liczby kapilar aktywnych) służy do matematycznego opisu tego zjawiska. Połączenie wzrostu powierzchni wymiany oraz zwiększenie przepływu krwi pozwala na rzeczywiste zwiększenie zużycia tlenu przez tkanki a tym samym pokrycie ich nasilonego zapotrzebowania metabolicznego (169).

Badania ostatniej dekady pokazują, że neuropeptydy odgrywają rolę w protekcji tkanek, ponieważ wykazują zdolność do zwiększania całkowitego przepływu krwi w

naczyniach, powierzchni wymiany naczyniowej oraz niekiedy przepuszczalności kapilar, co ma istotny wpływ na dynamikę procesów naprawczych w fazie zapalenia po dokonanym uszkodzeniu (13, 79, 80, 81, 94, 202). Podrażnienie zakończeń nerwów czuciowych w obrębie jamy ustnej powoduje aktywację żylakowatości i uwolnienie neuropeptydów, z których CGRP oraz SP stanowią najważniejsze czynniki modulujące lokalny przepływ w tkance, a tym samym odgrywają istotną rolę w mechanizmie protekcji (18, 33, 42, 44). CGRP jest peptydem, którego efekty naczyniorozszerzające zostały już dość dobrze poznane. W obrębie naczyń mikrokrażenia, głównie arterioli, CGRP działa na ich mięśnie gładkie za pośrednictwem receptora CGRP₁, którego aktywacja prowadzi do wzrostu aktywności cyklazy adenylowej, w następstwie czego dochodzi do wzrostu poziomu cAMP i aktywacji kinazy A, która fosforyluje, zwiększając w ten sposób przepuszczalność kanałów potasowych (ATP wrażliwych) (90, 173). Wzrost przepuszczalności kanałów jonowych dla potasu w obrębie miocytów gładkich powoduje ich rozkurcz i rozszerzenie arterioli, a tym samym zwiększenie przepływu w łożysku naczyniowym. Receptory dla CGRP znajdują się także na komórkach śródbłonna - ich aktywacja nasila generację tlenu azotu (przede wszystkim w następstwie aktywacji izoformy śródbłonkowej syntazy NO), czego następstwem jest wzrost uwalniania tej molekuly - tlenek azotu pobudzając produkcję cyklicznego guanozyno-monofosforanu (cGMP) wykazuje silne działanie rozkurczające na miocyty gładkie ściany naczyniowej, co dodatkowo istotnie zwiększa przepływ naczyniowy (140, 141). Obydwa te mechanizmy oddziaływania CGRP na mięśnie gładkie (pośredni i bezpośredni) mają znaczenie w procesie neurogennego rozszerzenia naczyń zależnego od CGRP (53, 96, 161, 165, 192, 215). W obrębie jednostek mikrokrażenia w zakresie arterioli większe znaczenie wydaje się odgrywać mechanizm bezpośredni zależny od kanałów potasowych, natomiast mechanizm NO zależny pełni przeważającą rolę w

obrębie drobnych naczyń doprowadzających oraz w różnych odcinkach tętnie mięśniowych (18, 137, 160, 167). Substancja P oddziałująca za pośrednictwem receptora NK₁ powoduje rozszerzenie naczyń (efekt ten jest znacznie mniej nasilony i krótszy czasowo w porównaniu z efektami oddziaływania CGRP) i zależy wyłącznie od lokalnie zwiększonej syntezy tlenu azotu. Jednak głównym efektem oddziaływania endogennego SP In vivo na naczynia jest wzrost przepuszczalności ich ścian, który następuje nie tylko na skutek bezpośredniego oddziaływania za pośrednictwem receptora NK₁, ale także aktywacji mastocytów i lokalnego wzrostu uwalniania histaminy (41, 96, 109, 131).

Wspólnym efektem oddziaływania CGRP oraz SP uwalnianych przez aktywowane włókna czuciowe jest wzrost całkowitego przepływu krwi w obrębie naczyń, arteriol i kapilar mikrokrażenia oraz wzrost wymiany tlenu i składników odżywczych w obrębie tkanki przyległej do obszaru uszkodzenia, co pozwala na aktywację i migrację fibroblastów w obrębie obszaru granicznego między tkanką zdrową a okolicą uszkodzenia. Angiogeneza we wczesnym etapie gojenia w strefie gojenia uszkodzenia (ziarniny), która stanowi kluczowy proces dla przywrócenia integralności uszkodzonej tkanki może zachodzić wyłącznie w warunkach nie zaburzonej perfuzji naczyń krwionośnych komunikujących z obszarem nowopowstałego unaczynienia (13, 55, 75, 79, 138, 144). Skuteczna ewakuacja produktów przemiany materii przez zwiększony przepływ krwi w procesie stymulacji przez neuropeptydy jest niezbędnym warunkiem prawidłowej regeneracji w miejscu uszkodzenia (ryc.6).



Rycina 5. Przedstawia mechanizm neuro - humoralnej kontroli jednostki mikrokrążenia. Aktywacja włókien czuciowych prowadzi do uwolnienia CGRP oraz SP z ich zakończeń. Neuropeptydy działając za pośrednictwem swoistych receptorów CGRP₁ oraz NK₁ na drodze oddziaływań bezpośrednich oraz za pośrednictwem NO prowadzą do relaksacji mięśniówki gładkiej ścian naczyń i zwiększenia przepływu w jednostce mikrokrążenia. Następstwem jest zwiększenie podaży tlenu i glukozy oraz dostarczenie komórek zapalenia i czynników wzrostu w miejsce uszkodzenia. Czynniki te istotnie nasilają angiogenezę i namnażanie się komórek podścieliska, czego następstwem jest wytworzenie pełnowartościowej blizny w miejscu uszkodzenia. Przedstawiono także włókna adrenergiczne, których wpływy na naczynia krwionośne mediowane przez swoiste receptory adrenergiczne są przeciwstawne do oddziaływań układu sensorycznego.

CGRP – peptyd pochodny genu kalcytoniny, SP – Substancja P, NO – tlenek azotu, NPY – neuropeptyd Y, NA – noradrenalina, Y₁ – receptor neuropeptydowy 1, α₁ – adrenoreceptor α₁, β₂ – adrenoreceptor β₂, BK – bradykinina, His – histamina, PGs – prostaglandyny

2. CEL PRACY:

Celem niniejszych badań było określenie wpływu włókien czuciowych i ich mediatorów na proces gojenia ostrych owrzodzeń błony śluzowej policzka i języka ze szczególnym uwzględnieniem ich znaczenia w kontroli przepływu tkankowego krwi.

Szczegółowymi celami przeprowadzonych badań było:

- Określenie wpływu aktywności podstawowej włókien czuciowych typu C w kontroli przepływu tkankowego w prawidłowej błonie śluzowej oraz brzegu owrzodzeń jamy ustnej oraz zbadanie ich znaczenia w modulacji procesu gojenia ostrych owrzodzeń błony śluzowej policzka i języka.

- Wyjaśnienie roli mediatora układu sensorycznego - CGRP w regulacji przepływu tkankowego w obrębie prawidłowej błony śluzowej oraz brzegu owrzodzeń jamy ustnej oraz poznanie znaczenia tego neuropeptydu w modulacji procesu gojenia ostrych owrzodzeń błony śluzowej policzka i języka.

- Określenie znaczenia receptorów peptyderygicznych w kontroli przepływu tkankowego w prawidłowej błonie śluzowej i brzegu owrzodzeń jamy ustnej oraz wyjaśnienie ich udziału w modulacji procesu gojenia ostrych owrzodzeń błony śluzowej policzka i języka.

- Określenie znaczenia mikrokrążeniowego przepływu krwi w obszarze uszkodzenia błony śluzowej w procesie jej gojenia w spoczynku oraz w warunkach stymulacji receptorów peptyderygicznych.

3. MATERIAŁ I METODY

Badania doświadczalne zostały przeprowadzone na szczurach rasy Wistar, obu płci, wagi 200 – 240g. Zwierzęta przed eksperymentem przebywały w pomieszczeniu o stałej temperaturze pokojowej z zachowanym dwunastogodzinnym cyklem świetlnym. Zwierzęta otrzymywały standardowy pokarm dla gryzoni, miały także zapewniony stały dostęp do wody. Na 24 godziny przed eksperymentem zwierzęta nie otrzymywały pokarmu, mając stały dostęp do wody. Narkozę (Vetbutal 25 mg/kg Biovet Puławy) podawano dootrzewnowo w okresie nie przekraczającym 60 minut przed planowanym doświadczeniem. Zwierzęta po uśpieniu umieszczane były na stole operacyjnym, stała temperatura ciała utrzymywana była przy za pomocą systemu grzewczego kontrolowanego za pomocą doodbytniczego termistora (FST TR-100). Przed przystąpieniem od eksperymentu dokonywano kontrolnego pomiaru wartości przepływu mikrokraźeniowego w błonie śluzowej policzka oraz języka u zwierząt w poszczególnych grupach doświadczalnych. Ostre owrzodzenie w obrębie grzbietowej części języka oraz policzka wywoływano za pomocą polietylenowego wydrążonego cylindra o średnicy 4mm, który przykładano do powierzchni tkanek i po uzyskaniu szczelnego połączenia między tkanką a brzegiem cylindra ten ostatni wypełniano na 30 sekund 50 uL 70% kwasu octowego. Następnie kwas ewakuowano a tkankę przepłukiwano solą fizjologiczną. Po upływie 120 min od indukcji owrzodzenia dokonywano kontrolnego pomiaru wartości przepływu mikrokraźeniowego w obrębie prawidłowej błony śluzowej policzka oraz języka i brzegu owrzodzeń. Po upływie 7 dni od indukcji uszkodzeń zwierzęta były usypiane przez dootrzewnowe podanie Vetbutalu (25 mg/kg). Następnie dokonywano pomiarów przepływu mikrokraźeniowego w

obrębie zdrowej błony śluzowej policzka i języka oraz w brzegu owrzodzeń, planimetrycznie mierzono powierzchnię uszkodzeń i pobierano tkankę celem analizy histologicznej owrzodzeń, następnie zwierzęta uśmiercano przez dootrzewnowe podanie znacznej ilości środka znieczulającego (Vetbutal).

Badania przeprowadzono zgodnie z wytycznymi i za zgodą Komisji Bioetycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

3.1. INNE PROCEDURY I TECHNIKI EKSPERYMENTALNE

Dla określenia roli unerwienia sensorycznego w modulacji potencjału naprawczego błony śluzowej jamy ustnej dokonywano chemicznej eliminacji tej składowej unerwienia. Odnerwienie sensoryczne układu nerwowego przeprowadzano za pomocą techniki farmakologicznej denerwacji stosując w tym celu neurotoksynę – kapsaicynę (Sigma), którą w postaci 1% roztworu podawano zwierzętom podskórnym w narkozie eterowej przez okres trzech dni w odstępach 12-godzinnych we wzrastających dawkach – (odpowiednio 2, 5, 10 oraz 50 mg. substancji podawanej każdemu odnerwionemu zwierzęciu doświadczalnemu). Po 10 dniach od indukcji odnerwienia sensorycznego wykonywano test rogówkowy (aplikacja kropli 1% roztworu kapsaicyny na rogówkę) pozwalający stwierdzić czy ablacja unerwienia była skuteczna. Pozytywny test rogówkowy-dodatni test na odruch powiekowy u zwierzęcia, któremu podano kroplę 1 procentowego roztworu kapsaicyny na rogówkę wskazujący na niekompletne odnerwienie czuciowe wykluczał zwierzę z dalszych badań.

W celu wykazania znaczenia lokalnego przepływu krwi w procesie gojenia owrzodzeń jamy ustnej w grupie zwierząt ($n = 8$) dokonano przewlekłego niedokrwienia tkanek jamy ustnej. W grupie tej nacinano powłoki po stronie lewej w stosunku do krtani i tchawicy na długości około 5mm, rozpoczynając cięcie około 2 mm od lewego kąta żuchwy. Po dokonaniu cięcia skórniego odsłaniano podżuchwowe gruczoły ślinowe, które odpreparowywano. Odsłonięte mięśnie proste szyi i powięź oddzielono bez użycia ostrych narzędzi w celu uniknięcia krwawienia. Następnie wypreparowywano lewą tętnicę szyjną zewnętrzną i po oddzieleniu jej od powięzi pod naczynie podkładano nić chirurgiczną, naczynie zwężano celem osiągnięcia okluzji około 50%. Stopień okluzji naczynia oceniano za pomocą przepływomierza ultrasonograficznego (elektroda RS1 – 1,5 mm średnicy). Wartość przepływu całkowitego 18 ml/min (wzrost ponad 35% w stosunku do kontroli) uznawano za znamienne dla redukcji światła naczynia o około 50% (obliczany z wzoru Puisella dla prędkości przepływu krwi przez naczynia sztywne przy parametrze D nie przekraczającym 2 mm).

3.2. ZASTOSOWANE SUBSTANCJE FARMAKOLOGICZNE

Zwierzęta doświadczalne w poszczególnych grupach otrzymywały zgodnie z planem badań następujące substancje aktywne: dootrzewnowo CGRP (50mg/kg) (Sigma) oraz CGRP₈₋₃₇ (50mg/kg) (Sigma), podskórną podawano kapsaicynę (Sigma) (roztwór 1% według opisanego wyżej protokołu). Substancje czynne podawane były co 48 godzin w okresie gojenia uszkodzeń w postaci roztworu w soli fizjologicznej.

3.3. PROCEDURY POMIAROWE

W badaniach zastosowano następujące procedury pomiarowe:

Pomiar całkowitego przepływu krwi w obrębie tętnicy szyjnej wspólnej w grupie zwierząt, u których dokonywano częściowej okluzji lewej tętnicy szyjnej (w celu oceny stopnia redukcji przepływu). Do pomiarów użyto sondy IRS o przekroju 1,5 mm wykorzystującej zjawisko przesunięcia fazowego fali ultradźwiękowej na strumieniu przemieszczających się krwinek. Sygnał podawany był do przetwornika (Altron T407), który z zastosowaniem analizy Dopplerowskiej podaje wynik w czasie rzeczywistym jako objętości krwi przepływającej w jednostce czasu (ml/min). Metodę tą przy zastosowaniu sondy i algorytmów przetwornika dedykowanych dla małych naczyń charakteryzuje wysoka precyzja i niski błąd pomiaru (57).

W grupach zwierząt kontrolnych oraz otrzymujących preparaty farmakologiczne dokonywano kontrolnego pomiaru średniego ciśnienia tętniczego w celu ustalenia czy podawane substancje nie powodują nieprzewidzianych efektów krążeniowych (efekty te badano na dwu losowo wybranych osobnikach z każdej grupy doświadczalnej) w trakcie trwania gojenia (w 72 godzinie gojenia). Zwierzęta były sztucznie wentylowane w tym celu nacinano powłoki nad krtanią i tchawicą na długości około 1,5 cm, rozpoczynając cięcie w połowie odległości między kątami żuchwy. Po dokonaniu cięcia skórno odsłaniano podżuchwowe gruczoły ślinowe, które odpreparowywano. Odsłonięte mięśnie proste szyi i powięzie oddzielono bez użycia ostrych narzędzi w celu uniknięcia krwawienia. Odsłoniętą tchawicę wypreparowywano a następnie podkładano nić chirurgiczną, tchawicę przecinano w celu wprowadzenia polietylenowego drenu o przekroju 3 mm, którego koniec łączono z respiratorem

używając następujących parametrów wentylacji: częstość oddechu 40 razy na minutę, objętość oddechowa 1,5 ml. Respirator pobierał powietrze pokojowe o temperaturze około 26° C i wilgotności około 50% zapewniając komfort cieplny. Do dosercowego końca odsłoniętej tętnicy szyjnej wspólnej lewej zwierzęcia wprowadzano dren polietylenowy o średnicy 2mm. Wypełniony solą, wolny koniec drenu łączono z przetwornikiem elektromagnetycznym połączonym z kardiomonitorem (STATHAM). Po zwolnieniu zacisku i usunięciu powietrza z układu oraz wyrównaniu ciśnień za pomocą mikrozaworów, monitorowano ciśnienie skurczowe, rozkurczowe oraz średnie, których przebieg obserwowano na ekranie monitora w postaci krzywej w czasie rzeczywistym oraz rejestrowano. Wartości chwilowe ciśnienia średniego przedstawiane były na ekranie w formie numerycznej.

3.4. POMIAR PRZEPIYU MIKROKRAŻENIOWEGO W BŁONIE ŚLUZOWEJ I PODŚLUZOWEJ POLICZKA I JĘZYKA

Przepływ w splotach naczyniowych podśluzowych badano za pomocą elektrody firmy Perimed numer 407 wykorzystującej do badania przepływu światło lasera rubidowego o długości fali 560 nm, gdzie przepływ oceniany był na podstawie przesunięcia fazowego wiązki światła odbitego od powierzchni przemieszczających się krwinek. Analiza Dopplerowska sygnału wykorzystywana przez przetwornik cyfrowy Perimed 4001 Master pozwala wyrazić wielkość przepływu w badanej tkance w jednostkach arbitralnych i jest uznana jako wiarygodna metoda służąca ocenie przepływu w błonie śluzowej i podśluzowej tkanek jamy ustnej (57). Przepływ tkankowy oceniano w czasie 30 sekund. Elektroda pomiarowa była unieruchamiana

przy użyciu statywu dedykowanego urządzeniu. Końcówka elektrody umieszczana była prostopadle do powierzchni błony śluzowej. Dla zapewnienia możliwie stałych warunków rejestracji pozycja tkanek jamy ustnej była ustalana za pomocą specjalnie zaprojektowanego uchwytu nie wywierającego nacisku na ścianę policzka czy stabilizowanego języka. Błona śluzowa przed dokonaniem pomiaru była zwilżana roztworem 0,9% soli fizjologicznej. Pomiarów dokonywano w pomieszczeniu zaciemnionym w celu uniknięcia interferencji światła widzialnego z długościami okółopomiarowymi i pomiarowymi wiązki światła laserowego. Przetwornik Perimed 4001 Master był każdorazowo podłączany do rejestratora. Do rejestracji wykorzystano komputer PC z platformą programową Microsoft Windows 98, zakres rejestrowanych parametrów, sposób ich odwzorowania graficznego w postaci krzywych oraz uwzględniany w pomiarach błąd statystyczny zaprogramowano w Języku Borland Delphi. Po dokonanej obróbce matematycznej danych cyfrowych w czasie rzeczywistym dokonywano wizualizacji uśrednionych danych za pomocą krzywych, odrębnych dla każdego eksperymentu. Po dokonanej obróbce dane były rejestrowane na dyskach optycznych.

3.5. POMIAR POWIERZCHNI USZKODZEŃ BŁONY ŚLUZOWEJ I OCENA HISTOLOGICZNA STOPNIA TYCH USZKODZEŃ

Planimetryczna ocena obszaru uszkodzeń oparta została na statystycznej analizie barwnej obrazu cyfrowego po jednorazowej geometrycznej dekonwolucji obrazu (program ProVision Microsoft). Oceny planimetrycznej uszkodzeń po zakończeniu reperfuzji dokonywano w poszczególnych grupach zwierząt doświadczalnych w obrębie ściany policzka oraz powierzchni języka. Po ekspozycji błony śluzowej dokonywano zdjęć cyfrowych kamerą Lumix EZ20 techniką makrofotografii stosując stałe nastawy

czasu otwarcia migawki i przysłony oraz ustaloną odległość obiektywu od preparatu – około 4 cm, co zapewniło ich porównywalność. Dalsza obróbka cyfrowa zdjęcia polegała na wzmocnieniu kontrastów barwnych w zakresie czerwieni za pomocą algorytmu dekonwolucji w zakresie światła widzialnego a następnie określeniu procentowego udziału obszarów zmienionych martwiczo oraz na tle niedokrwienia błony śluzowej.

Tkanki były pobierane (fragment policzka zawierający owrzodzenie oraz odcinek języka) i utrwalane w 10% buforowanej formalinie, a następnie przeprowadzane do parafiny w procesorze tkankowym Hypercenter XP firmy Shandon. Procedura ta obejmuje umieszczenie materiału kolejno: w 70% roztworze etanolu, 95% roztworze etanolu, czterokrotnie w 100% roztworze etanolu, trzykrotnie w ksylenie i dwukrotnie w parafinie w temperaturze 60°C. Z kostek parafinowych skrojono skrawki o grubości 5 µm i po odparafinowaniu barwiono rutynowo hematoksyliną i eozyną.

Preparaty histologiczne tkanki błony śluzowej jamy ustnej w poszczególnych grupach eksperymentalnych oceniane były przez doświadczonego histopatologa (dr Wojciech Szczepański, Katedra Patomorfologii CMUJ), który określał ich przynależność do poszczególnych stopni skali własnej. Skala własna stworzona została na podstawie funkcjonującej skali stosowanej dla oceny uszkodzeń błony śluzowej ściany przewodu pokarmowego (błony śluzowej jelita) (172), zmian dokonano po uwzględnieniu specyfiki i odmienności obrazu histologicznego gojącej się błony śluzowej jamy ustnej. Wyniki badań histologicznych opracowane dla poszczególnych grup doświadczalnych sklasyfikowane pod względem przynależności do skali uszkodzenia analizowane były statystycznie a następnie wyniki wyrażano jako procentowe odchylenie od kontroli, którą stanowiła prawidłowa błona śluzowa (policzka oraz języka).

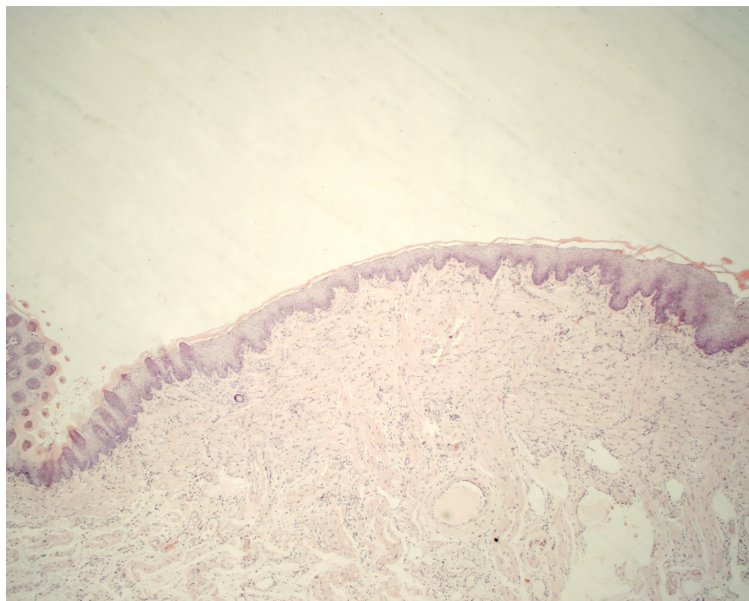
Na podstawie zróżnicowania obrazu histologicznego tkanek po 7 dniowym okresie gojenia, wyróżniono stopnie różnicujące stan błony śluzowej od stanu najmniejszego nasilenia zmian patologicznych (wysoki stopień wygojenia) do zmian o dużym nasileniu (niski stopień wygojenia).

Stopień I – Błona śluzowa pokryta nabłonkiem bez cech nacieku zapalnego (Ryc.6)

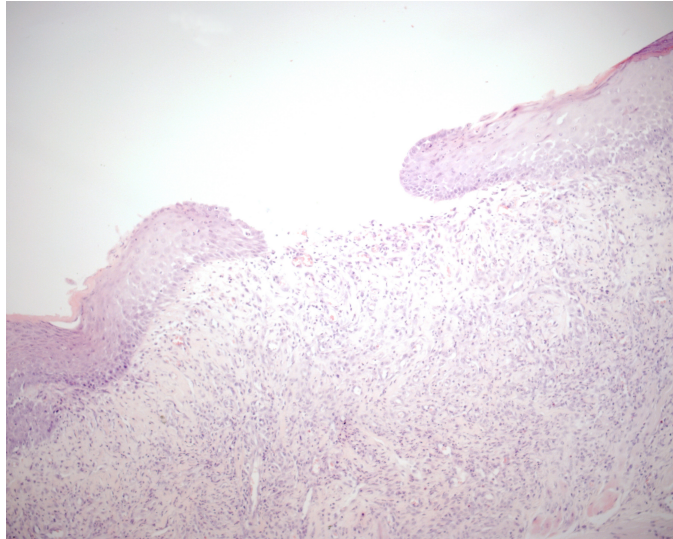
Stopień II - Błona śluzowa pokryta nabłonkiem płaskim z cechami podśluzowego nacieku zapalnego (Ryc.7)

Stopień III – Owrzodzenie częściowo wygojone z obszarem centralnym ziarniny i uogólnionym naciekiem zapalnym (Ryc.8)

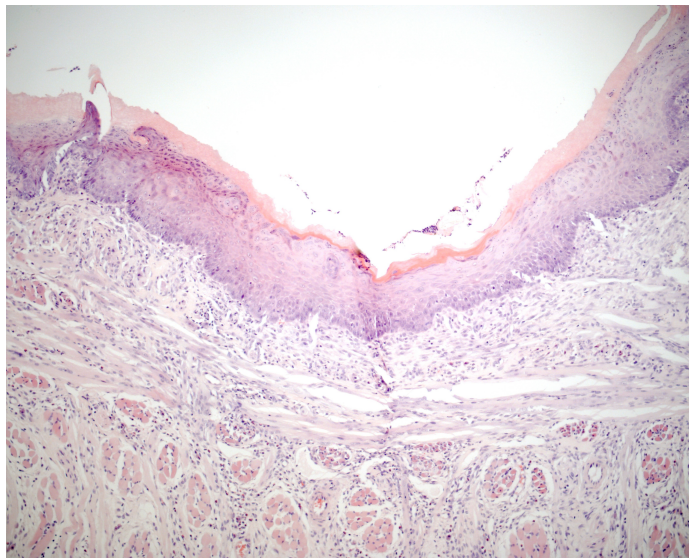
Stopień IV – Owrzodzenie nie wygojone, pokryte ziarniną, z uogólnionym naciekiem zapalnym (Ryc.9)



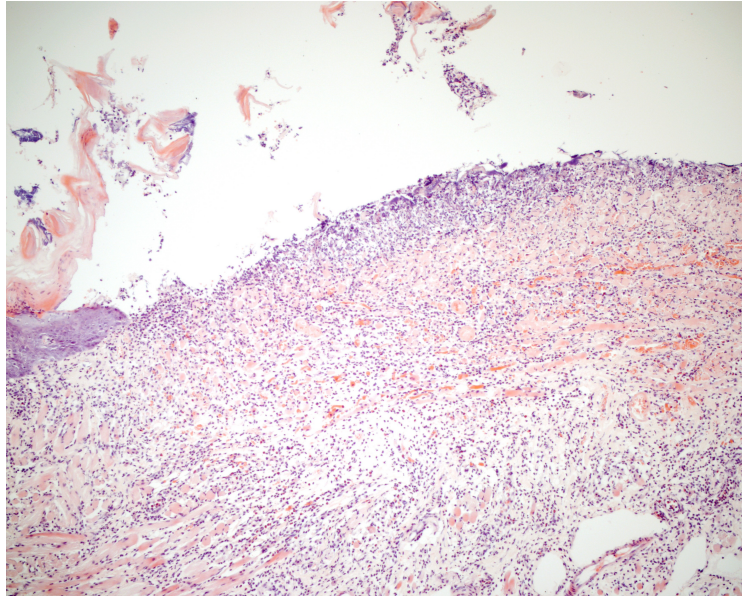
Ryc. 6 przedstawia obraz histologiczny zagojonej błony śluzowej - błona śluzowa pokryta nabłonkiem bez cech nacieku zapalnego (odpowiada stopniowi I wg. skali własnej).



Ryc. 7 przedstawia obraz histologiczny błony śluzowej w przebiegu procesu gojenia - błona śluzowa pokryta nabłonkiem z cechami nacieku zapalnego (odpowiada stopniowi II wg. skali własnej).



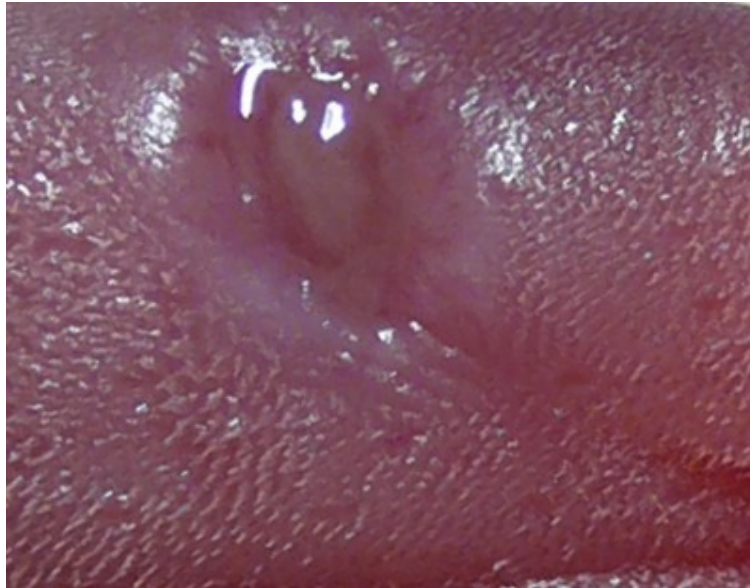
Ryc. 8 przedstawia obraz histologiczny błony śluzowej z częściowo wygojonym owrzodzeniem z obszarem centralnym ziarniny i uogólnionym naciekiem zapalnym w obrębie błony podśluzowej - (odpowiada stopniowi III wg. skali własnej).



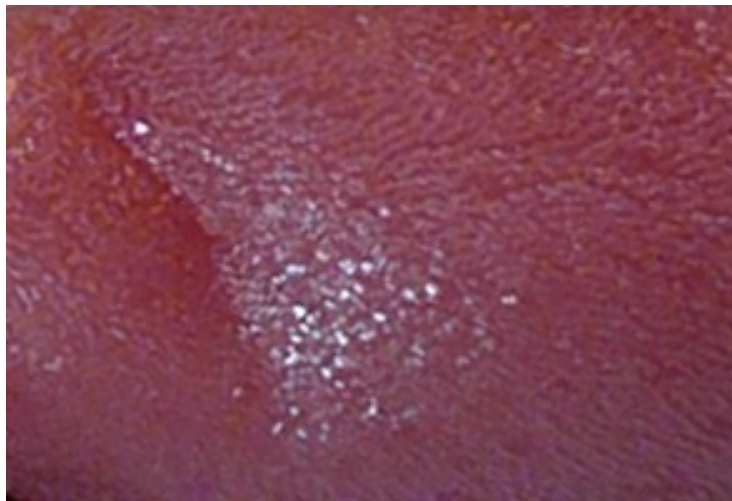
Ryc. 9 przedstawia obraz histologiczny nie wygojonego owrzodzenia błony śluzowej pokrytego ziarniną z uogólnionym naciekiem - (odpowiada stopniowi IV wg. skali własnej).



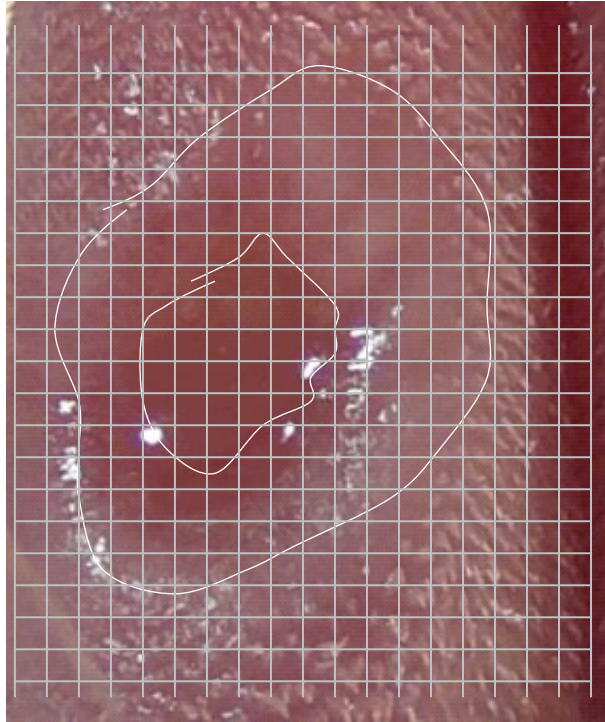
Ryc. 10 Obraz świeżego uszkodzenia powstałego w wyniku bezpośredniego kontaktu powierzchni błony śluzowej jamy ustnej z 70% kwasem octowym. Widoczny jest obszar tkanki martwiczej otoczonej przez obszar niedokrwienia.



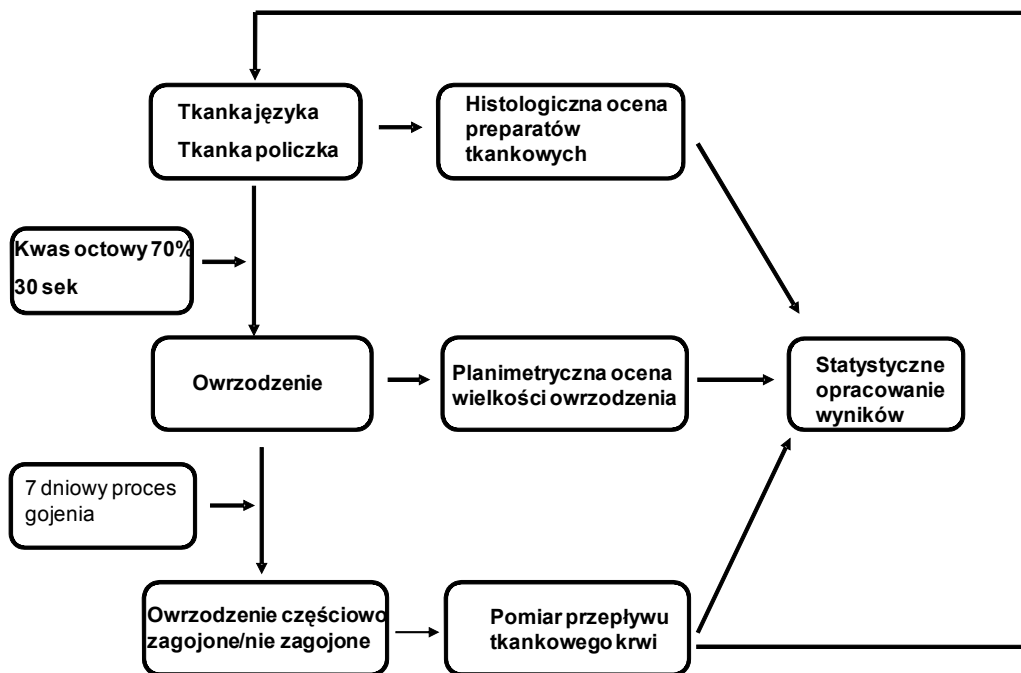
Ryc. 11 Obraz gojącego się owrzodzenia, w obrębie którego uformowany jest martwicy krater oraz brzeg z aktywną tkanką ziarninową.



Ryc. 12 Obraz zagojonego owrzodzenia. Na powierzchni błony śluzowej języka widoczna jest blizna.



Ryc. 13 Rycina przedstawia metodykę planimetrycznej oceny powierzchni owrzodzeń – przykład uformowanego, nie zagojonego owrzodzenia, w obrębie którego wyróżnić można powierzchnię krateru oraz brzegu. Na podstawie liczby kratek o boku $0,1\text{ mm}^2$ zawartych w obrębie owrzodzenia oceniana jest jego powierzchnia.



Ryc. 14 Przedstawia schemat obrazujący metodykę badań z uwzględnieniem najważniejszych etapów doświadczeń. Uwzględniono metodykę indukcji owrzodzeń oraz rodzaj wykonanych pomiarów.

3.6. STATYSTYKA

Dla poszczególnych grup obliczono wartości średnie i odchylenie standardowe. Średnią wartość z grupy kontrolnej przyjęto jako 100%, co stanowiło wartości odniesienia dla grup badanych. W poszczególnych grupach badanych obliczono wartość średnią, którą wyrażono jako % w odniesieniu do średniej uzyskanej w grupie kontrolnej. Istotność statystyczną różnic pomiędzy wartościami średnich obliczano przy pomocy testu t'Studenta (Statistica 5.1.) - Microsoft. Obliczano wartość średnią i odchylenie standardowe.

3.7. GRUPY DOŚWIADCZALNE:

W celu wyjaśnienia znaczenia unerwienia czuciowego w kontroli lokalnego mikrokrążenia i w modulacji zdolności regeneracyjnych błony śluzowej jamy ustnej przeprowadzono stosownie do celu pracy następujące serie doświadczeń.

Grupy doświadczalne serii A

- Grupa 1 – grupa kontrolna, (n=8). U zwierząt tej grupy wywoływano owrzodzenia błony śluzowej jamy ustnej (na powierzchni policzka i języka) a następnie były one pozostawione na okres 7 dni ze swobodnym dostępem do pokarmu i wody. Zwierzęta nie otrzymywały preparatów farmakologicznych. 120 minut po indukcji owrzodzeń dokonywano pomiarów mikrokrążeniowego przepływu krwi w prawidłowej błonie śluzowej oraz brzegu owrzodzenia, pomiar powtarzano po okresie 7 dni gojenia a następnie po uśpieniu zwierząt pobierano tkanki celem morfologicznej oceny uszkodzeń.

- Grupę 2 – stanowiły zwierzęta (n=8), u których wywoływano częściowe, jednostronne niedokrwienie błony śluzowej jamy ustnej przez 50% okluzję tętnicy szyjnej wspólnej, u których następnie po stronie niedokrwienia indukowano owrzodzenia błony śluzowej jamy ustnej jak w grupie 1 i postępowano z nimi analogicznie przez okres 7 dni. Zwierzęta te również nie otrzymywały preparatów farmakologicznych, 120 minut po indukcji owrzodzeń oraz po okresie gojenia (7 dni) dokonywano u nich pomiaru śluzówkowego przepływu krwi i stopnia uszkodzenia błony śluzowej.

Grupy doświadczalne serii B

Seria ta obejmuje grupy, na których przeprowadzano ocenę roli unerwienia czuciowego w modulacji procesu gojenia owrzodzeń błony śluzowej jamy ustnej (na powierzchni policzka i języka) u zwierząt, otrzymujących preparaty farmakologiczne oddziałujące selektywnie na układ sensoryczny ustalono następujące grupy doświadczalne:

- Grupa 3 – (n=8) dootrzewnowe podanie agonisty receptora CGRP₁ (CGRP 50 mg/kg i.p.). CGRP podano 30 minut przed eksperymentem.

- Grupa 4 – dootrzewnowe podanie antagonisty receptora CGRP₁ (CGRP₈₋₃₇ – 50 mg/kg). CGRP₈₋₃₇ podano 30 minut przed eksperymentem.

- Grupa 5 – dootrzewnowe podanie agonisty receptora CGRP₁ (CGRP 50 mg/kg i.p.) po wcześniejszym podaniu antagonisty receptora CGRP₁ (CGRP₈₋₃₇ – 50 mg/kg). CGRP₈₋₃₇ oraz CGRP podawane były 60 oraz 20 (odpowiednio) minut przed właściwym eksperymentem.

- Grupa 6 – chroniczna denerwacja sensoryczna po podaniu kapsaicyny (2, 5, 10 i 50 mg). Kapsaicyna podawana była w formie 1% wodno/alkoholowego roztworu we wzrastających dawkach 2, 5, 10 oraz 50 mg. z zachowaniem 12 godzinnych odstępów czasu (miedzy podaniem kolejnych dawek). Chronicznego odnerwienia dokonano 7 dni przed doświadczeniem.

- Grupa 7 – dootrzewnowe podanie agonisty receptora CGRP₁ (CGRP 50 mg/kg i.p.) u zwierząt po chronicznej denerwacji sensorycznej indukowanej podaniem kapsaicyny (2, 5, 10 i 50 mg/72h). Kapsaicyna podawana była w wyżej opisany sposób. CGRP podane zostało 30 minut przed eksperymentem.

Grupy doświadczalne serii C

W tej serii dokonano oceny roli unerwienia czuciowego w modulacji procesu gojenia owrzodzeń błony śluzowej jamy ustnej u zwierząt z uprzednio operacyjnie, jednostronnie ograniczonym przepływem w obrębie błony śluzowej jamy ustnej (na powierzchni policzka i języka) celem oceny roli unerwienia sensorycznego w kontroli mikrokrążenia i w procesie gojenia. Ustalono następujące grupy doświadczalne:

- Grupa 8 – (n=8) dootrzewnowe podanie agonisty receptora CGRP₁ (CGRP 50 mg/kg i.p.). CGRP podano w odstępie 30 minutowym przed doświadczeniem.

- Grupa 9 – dootrzewnowe podanie antagonisty receptora CGRP₁ (CGRP₈₋₃₇ – 50 mg/kg) CGRP₈₋₃₇ podano w odstępie 30 minutowym przed doświadczeniem.

- Grupa 10 – podskórne podanie neurotoksyny - kapsaicyny (2, 5, 10 i 50 mg/72h). Kapsaicyna podawana była w formie 1% wodno/alkoholowego roztworu we

wzrastających dawkach 2, 5, 10 oraz 50 mg. z zachowaniem 12 godzinnych odstępów czasu (miedzy podaniem kolejnych dawek). Chronicznego odnerwienia dokonano 7 dni przed doświadczeniem.

4. WYNIKI

Wyniki badań uzyskane w przeprowadzonych eksperymentach przedstawione zostały w postaci wartości uśrednionych z uwzględnieniem wielkości odchyłeń statystycznych (Test t'Studenta) i przedstawione w formie wykresów, gdzie poszczególne kolumny reprezentują średnie wartości parametrów uzyskanych w przebiegu dziesięciu doświadczeń, które analizowano statystycznie a następnie przedstawiono w formie procentowych odchyłeń porównywanych do kontroli lub wartości średnich danego parametru w poszczególnych grupach (zmiany w histologicznej skali własnej). We wszystkich grupach doświadczalnych oceniano zmiany mikrokrazeniowego przepływu krwi w brzegu owrzodzeń na błonie śluzowej języka i policzka.

Wyniki uzyskane w serii A

Grupa 1 - kontrolna, zwierzęta, u których indukowano owrzodzenie na powierzchni błony śluzowej policzka i języka bez podawania preparatów farmakologicznych. U zwierząt tych dokonano pomiarów wartości spoczynkowych mikrokrazeniowego przepływu krwi w błonie śluzowej oraz w brzegu owrzodzenia. 120 minut po indukcji owrzodzeń przepływ w tkance prawidłowej policzka oraz języka wynosił 41 ± 4 PU oraz odpowiednio 66 ± 5 PU. Przepływ mikrokrazeniowy zarejestrowany w brzegu owrzodzenia wynosił 82 ± 8 PU oraz 101 ± 12 PU (odpowiednio

dla zmian wywołanych na policzku oraz języku). Po 7 dniach dokonywano pomiarów przepływu krwi w prawidłowej błonie śluzowej policzka i języka w otaczającej tkance zdrowej oraz brzegu owrzodzeń. Przepływ mikrokraźeniowy w prawidłowej błonie śluzowej wynosił 41 ± 7 PU oraz 66 ± 5 PU (odpowiednio policzka i języka). Średnia wartość przepływu mikrokraźeniowego w brzegu owrzodzenia wyniosła 38 ± 8 PU oraz 61 ± 4 PU (odpowiednio dla błony śluzowej policzka i języka). Dokonywano planimetrycznej oceny powierzchni owrzodzeń, ponadto pobierano tkanki w celu histologicznej oceny uszkodzeń. Bezpośrednio po indukcji uszkodzeń owrzodzenia błony śluzowej na powierzchni policzka i języka wykazywały powierzchnię $4 \pm 0,5$ mm². W ocenie histologicznej owrzodzenia osiągnęły 4 stopień uszkodzenia bez cech nacieku zapalnego (uszkodzenie wczesne). Po 7 dniach gojenia powierzchnia owrzodzeń osiągnęła $1,5 \pm 0,2$ mm² i wykazywała drugi stopień uszkodzenia oceniana w skali histologicznej.

Grupa 2 - kontrolna, u zwierząt, u których wcześniej wywołano częściowe, jednostronne niedokrwienie błony śluzowej jamy ustnej i po stronie niedokrwienia indukowano owrzodzenia na powierzchni błony śluzowej policzka i języka. Zwierzętom tym bez podawania preparatów farmakologicznych pozostawiano swobodny dostęp do pokarmu i wody. Po 7 dniach dokonywano pomiarów przepływu krwi w uprzednio niedokrwionej prawidłowej błonie śluzowej policzka i języka oraz brzegu owrzodzeń. U zwierząt tych dokonano pomiarów wartości spoczynkowych mikrokraźeniowego przepływu krwi w błonie śluzowej oraz brzegu owrzodzenia. 120 minut po indukcji owrzodzeń przepływ w tkance prawidłowej policzka oraz języka wynosił 21 ± 5 PU oraz odpowiednio 36 ± 7 PU (Ryc.23). Przepływ mikrokraźeniowy zarejestrowany w brzegu owrzodzenia wynosił 44 ± 8 PU oraz 67 ± 9 PU (odpowiednio dla zmian wywołanych na policzku oraz języku). Po 7 dniach dokonywano pomiarów przepływu krwi w

prawidłowej błonie śluzowej policzka i języka w otaczającej tkance zdrowej oraz brzegu owrzodzeń. Przepływ mikrokraźeniowy w prawidłowej błonie śluzowej wynosił 28 ± 8 PU oraz 41 ± 6 PU (odpowiednio policzka i języka). Średnia wartość przepływu mikrokraźeniowego w brzegu owrzodzenia wyniosła 48 ± 7 PU oraz 70 ± 9 PU (odpowiednio dla błony śluzowej policzka i języka) (Ryc.24). Dokonywano planimetrycznej oceny powierzchni owrzodzeń, ponadto pobierano tkanki w celu histologicznej oceny uszkodzeń. Bezpośrednio po indukcji uszkodzeń owrzodzenia błony śluzowej na powierzchni policzka i języka miały powierzchnię $4 \pm 0,5$ mm². W ocenie histologicznej owrzodzenia osiągnęły 4 stopień uszkodzenia bez cech nacieku zapalnego (uszkodzenie wczesne). Po 7 dniach gojenia powierzchnia owrzodzeń osiągnęła $3 \pm 0,3$ mm² i wykazywała trzeci stopień uszkodzenia oceniana w skali histologicznej (Ryc.25).

Wartości powierzchni uszkodzeń błony śluzowej jamy ustnej (osobno dla błony śluzowej policzka oraz języka) obliczone na podstawie obrazu makroskopowego po 7 dniach gojenia, po opracowaniu statystycznym przyjęte zostały za 100%. Podobnie zarejestrowane wartości przepływu mikrokraźeniowego w brzegu owrzodzeń indukowanych na powierzchni języka oraz policzka przyjęte zostały za 100%, do czego porównywano zmiany średnich wartości LDBF w grupach zwierząt otrzymujących preparaty farmakologiczne.

Wyniki uzyskane w serii B

Grupa 3 - w której dootrzewnowo podawano agonistę receptora CGRP₁ (CGRP 50 mg/kg). Po 120 minutach od indukcji owrzodzeń na powierzchni błony śluzowej zarejestrowano znamienne ($p < 0,005$) wzrost LDBF w brzegu owrzodzeń o 36 oraz 20% w porównaniu do kontroli (odpowiednio dla języka i policzka) (Ryc.17). Po 7 dniach gojenia zarejestrowano znamienne ($p < 0,005$) wzrost przepływu mikrokraźeniowego w

okolicy brzegu owrzodzenia o 60 i 51% (odpowiednio dla powierzchni języka i policzka) (Ryc.20). W siódmym dniu gojenia uszkodzenie błony śluzowej i podśluzowej oceniane technikami histologicznymi na powierzchni języka osiągnęło stopień zerowy, natomiast w obrębie policzka stopień pierwszy (Ryc.21). Porównanie obrazów makroskopowych owrzodzeń wykazało znamiennej ($p < 0,005$) redukcję ich powierzchni w porównaniu do kontroli o 90 i 50% (odpowiednio dla owrzodzeń na powierzchni języka i policzka).

Grupa 4 - w której dootrzewnowo podawano antagonistę receptora CGRP_1 – (CGRP_{8-37} – 50 mg/kg). Po 120 minutach od indukcji owrzodzeń na powierzchni błony śluzowej zarejestrowano znamiennej ($p < 0,005$) redukcję LDBF w brzegu owrzodzeń o 25 oraz 20% w porównaniu do kontroli (odpowiednio dla języka i policzka) (Ryc.17). Po 7 dniach gojenia zarejestrowano znamiennej ($p < 0,005$) redukcję przepływu mikrokraźeniowego w okolicy brzegu owrzodzenia o 35 i 20% (odpowiednio dla powierzchni języka i policzka) (Ryc.20). W siódmym dniu gojenia uszkodzenie błony śluzowej i podśluzowej oceniane technikami histologicznymi na powierzchni języka osiągnęło stopień trzeci, natomiast w obrębie policzka stopień drugi (Ryc.21). Porównanie obrazów makroskopowych owrzodzeń wykazało znamiennej ($p < 0,005$) wzrost ich powierzchni w porównaniu do kontroli o 110 i 60% (odpowiednio dla owrzodzeń na powierzchni języka i policzka).

Grupa 5 – w której dootrzewnowo podano agonistę receptora CGRP_1 (CGRP 50 mg/kg i.p.) po wcześniejszym podaniu antagonisty receptora CGRP_1 (CGRP_{8-37} – 50 mg/kg). Po 120 minutach od indukcji owrzodzeń na powierzchni błony śluzowej zarejestrowano znamiennej ($p < 0,005$) redukcję LDBF w brzegu owrzodzeń o 20 oraz 15% w porównaniu do kontroli (odpowiednio dla języka i policzka) (Ryc.27). Po 7 dniach gojenia zarejestrowano znamiennej ($p < 0,005$) redukcję przepływu

mikrokrazeniowego w okolicy brzegu owrzodzenia o 29 i 18% (odpowiednio dla powierzchni języka i policzka) (Ryc.20). W siódmym dniu gojenia uszkodzenie błony śluzowej i podśluzowej oceniane technikami histologicznymi na powierzchni języka osiągnęło stopień trzeci, natomiast w obrębie policzka stopień drugi (Ryc.21). Porównanie obrazów makroskopowych owrzodzeń wykazało znamienne ($p<0,005$) wzrost ich powierzchni w porównaniu do kontroli o 95 i 40% (odpowiednio dla owrzodzeń na powierzchni języka i policzka).

Grupa 6 – w której dokonano chronicznej denerwacji sensorycznej po podaniu kapsaicyny (2, 5, 10 i 50 mg/72h). Po 120 minutach od indukcji owrzodzeń na powierzchni błony śluzowej zarejestrowano znamienne ($p<0,005$) redukcję LDBF w brzegu owrzodzeń o 40 oraz 20% w porównaniu do kontroli (odpowiednio dla języka i policzka) (Ryc.17). Po 7 dniach gojenia zarejestrowano znamienne ($p<0,005$) redukcję przepływu mikrokrazeniowego w okolicy brzegu owrzodzenia o 55 i 30% (odpowiednio dla powierzchni języka i policzka) (Ryc.20). W siódmym dniu gojenia uszkodzenie błony śluzowej i podśluzowej oceniane technikami histologicznymi na powierzchni języka osiągnęło stopień czwarty, natomiast w obrębie policzka stopień trzeci (Ryc.21). Porównanie obrazów makroskopowych owrzodzeń wykazało znamienne ($p<0,005$) wzrost ich powierzchni w porównaniu do kontroli o 80 i 85% (odpowiednio dla owrzodzeń na powierzchni języka i policzka).

Grupa 7 – w której dootrzewnowowo podano agonistę receptora CGRP₁ (CGRP 50 mg/kg i.p.) u zwierząt po chronicznej denerwacji sensorycznej po podaniu kapsaicyny (2, 5, 10 i 50 mg/72h). Po 120 minutach od indukcji owrzodzeń na powierzchni błony śluzowej nie zarejestrowano znamienych różnic LDBF w porównaniu do kontroli (zarówno dla języka jak i policzka) (Ryc.17). Po 7 dniach gojenia nie zarejestrowano znamiennej redukcji przepływu mikrokrazeniowego w

okolicy brzegu owrzodzenia (zarówno dla powierzchni języka i policzka) (Ryc.20). W siódmym dniu gojenia uszkodzenie błony śluzowej i podśluzowej oceniane technikami histologicznymi na powierzchni języka oraz policzka osiągnęło stopień drugi (Ryc.21). Porównanie obrazów makroskopowych owrzodzeń wykazało znamienne (p<0,005) redukcję ich powierzchni w porównaniu do kontroli o 40 i 34 % (odpowiednio dla owrzodzeń na powierzchni języka i policzka).

W poniższych grupach analizowano znaczenie redukcji przepływu w obrębie błony śluzowej jamy ustnej, co osiągnano przez częściowe zaciśnięcie tętnic szyjnych wspólnych. Kontrolę stanowiły zwierzęta z ograniczonym przepływem w obrębie błony śluzowej jamy ustnej, nie otrzymujące preparatów farmakologicznych.

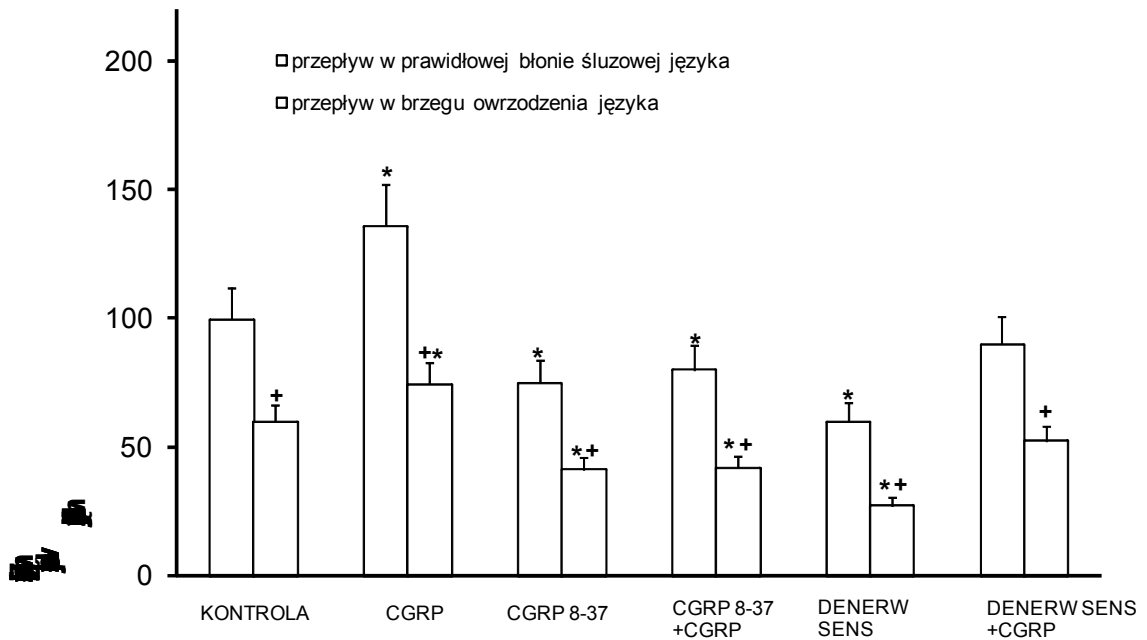
Wyniki uzyskane w serii C.

Grupa 8 – w której dootrzewnowo podano agonistę receptora CGRP₁ (CGRP 50 mg/kg i.p.) u zwierząt z ograniczonym jednostronnie przepływem w obrębie błony śluzowej jamy ustnej. Po 120 minutach od indukcji owrzodzeń w obrębie błony śluzowej zarejestrowano znamienne (p<0,005) wzrost LDBF w brzegu owrzodzeń błony śluzowej języka o 25% w porównaniu do kontroli. Po 7 dniach gojenia zarejestrowano znamienne (p<0,005) wzrost przepływu mikrokązeniowego w okolicy brzegu owrzodzenia w obrębie błony śluzowej języka 36%. Wartości LDBF w tkance policzka były niezmienione. W siódmym dniu gojenia uszkodzenie błony śluzowej i podśluzowej oceniane technikami histologicznymi na powierzchni języka osiągnęło stopień drugi, natomiast w obrębie policzka stopień trzeci (Ryc.26). Porównanie obrazów makroskopowych owrzodzeń wykazało znamienne (p<0,005) redukcję ich powierzchni w porównaniu do kontroli o 34 i 18% (odpowiednio dla owrzodzeń na powierzchni języka i policzka) (Ryc.28).

Grupa 9 - w której dootrzewnowo podawano antagonistę receptora CGRP₁ – (CGRP₈₋₃₇ – 50 mg/kg) u zwierząt z ograniczonym jednostronnie przepływem w obrębie błony śluzowej jamy ustnej. Po 120 minutach od indukcji owrzodzeń na powierzchni błony śluzowej zarejestrowano znamiennej ($p < 0,005$) redukcję LDBF w brzegu owrzodzeń o 25 oraz 18% w porównaniu do kontroli (odpowiednio dla języka i policzka). Po 7 dniach gojenia zarejestrowano znamiennej ($p < 0,005$) redukcję przepływu mikrokraźeniowego w okolicy brzegu owrzodzenia o 35 i 23% (odpowiednio dla powierzchni języka i policzka). W siódmym dniu gojenia uszkodzenie błony śluzowej i podśluzowej oceniane technikami histologicznymi na powierzchni języka i policzka osiągnęło stopień czwarty (Ryc.26). Obraz makroskopowy owrzodzeń nie wykazywał różnic w porównaniu do kontroli - owrzodzenia pozostawały nie zagojone (Ryc.28).

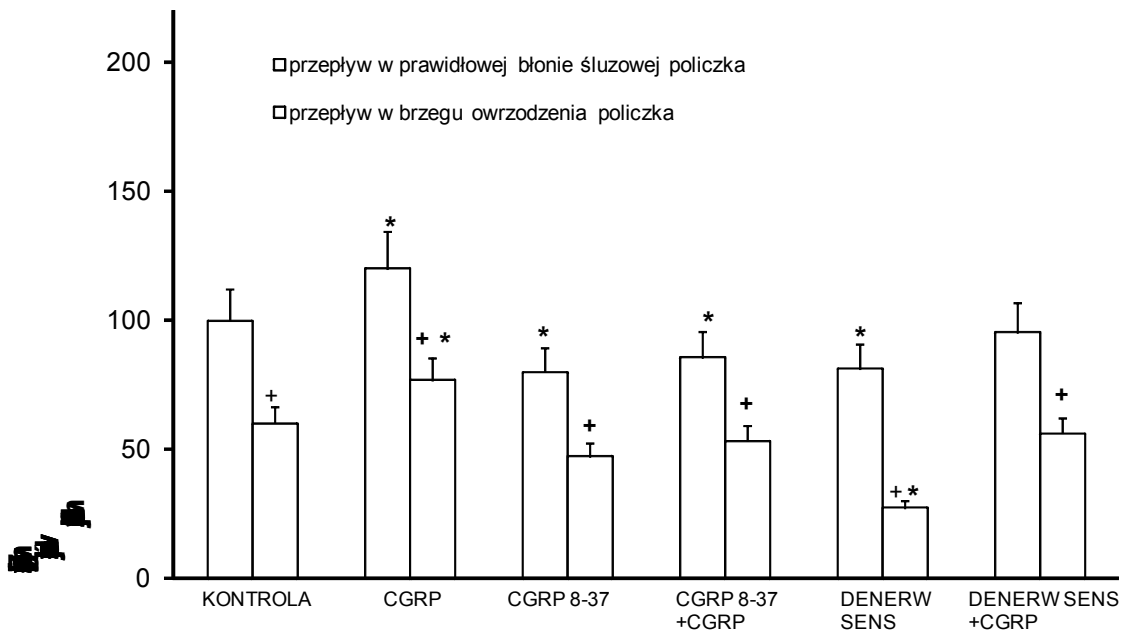
Grupa 10 - po chronicznej denerwacji sensorycznej po podaniu kapsaicyny (2, 5, 10 i 50 mg/72h) w warunkach jednostronnego ograniczenia przepływu w obrębie błony śluzowej jamy ustnej. Po 120 minutach od indukcji owrzodzeń na powierzchni błony śluzowej zarejestrowano znamiennej ($p < 0,005$) redukcję LDBF w brzegu owrzodzeń o 29 oraz 21% w porównaniu do kontroli (odpowiednio dla języka i policzka). Po 7 dniach gojenia zarejestrowano znamiennej ($p < 0,005$) redukcję przepływu mikrokraźeniowego w okolicy brzegu owrzodzenia języka o 29 i 18%. W siódmym dniu gojenia uszkodzenie błony śluzowej i podśluzowej oceniane technikami histologicznymi na powierzchni języka i policzka osiągnęło stopień czwarty (Ryc.26). Obraz makroskopowy owrzodzeń nie wykazywał różnic w porównaniu do kontroli - owrzodzenia pozostawały nie zagojone (Ryc.28).

Porównanie średniej wartości przepływu mikrokraźniowego w brzegu owrzodzenia języka oraz zdrowej błonie śluzowej języka 120 min. po ekspozycji na kwas octowy.



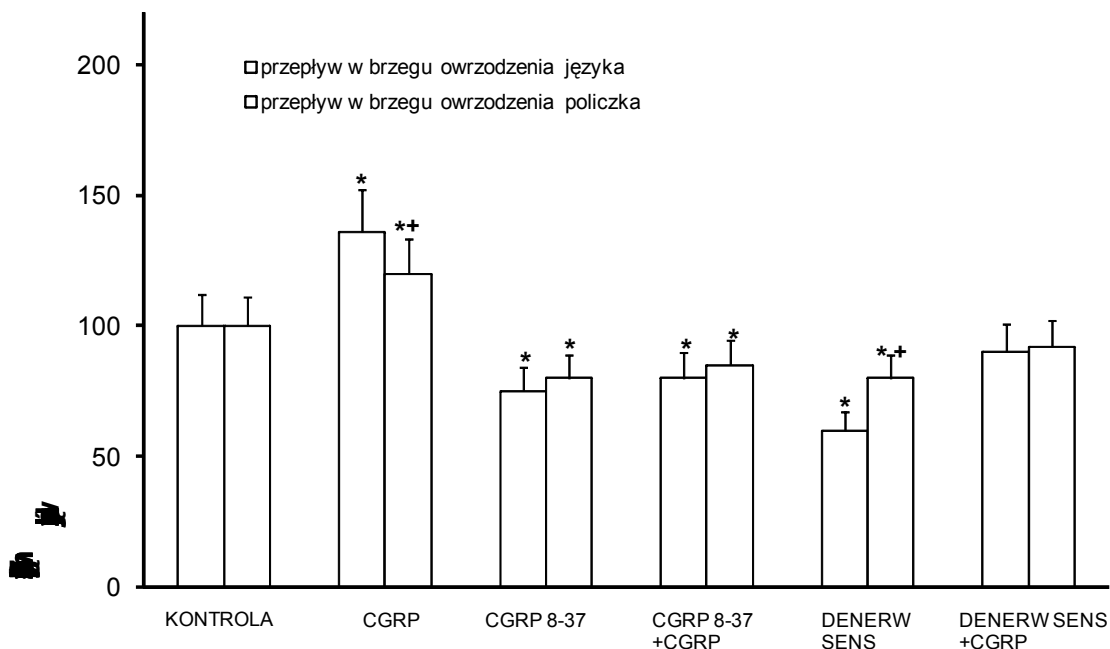
Ryc. 15 przedstawia średnią wartość przepływu mikrokraźniowego krwi zarejestrowanego w brzegu owrzodzenia oraz w obrębie zdrowej błony śluzowej na powierzchni języka 120 minut po jej ekspozycji na działanie 70% kwasu octowego. Kontrolę stanowią zwierzęta nie otrzymujące preparatów farmakologicznych. Przepływ mikrokraźniowy rejestrowano w grupach zwierząt otrzymujących CGRP (50 mg/kg i.p.), bloker receptorów CGRP_1 (CGRP_{8-37} 50mg/kg i.p.), CGRP po zastosowaniu blokera receptorów CGRP_1 (CGRP_{8-37} 50mg/kg i.p.), oraz u zwierząt po zastosowaniu chronicznej denerwacji sensorycznej przez aplikacje neurotoksyny - kapsaicyny bez oraz po podaniu CGRP (50 mg/kg i.p.), odnerwienia dokonano sposobem opisanym w rozdziale metodyka. Przedstawione wyniki stanowią średnią uzyskaną w grupach $n = 8$ zwierząt. Gwiazdki oznaczają znamienne statystycznie różnicę średniej wartości przepływu w porównaniu do zarejestrowanego w grupie kontrolnej (za wartość kontrolną przyjęto średni przepływ mikrokraźniowy rejestrowany w prawidłowej błonie śluzowej). Krzyżyki oznaczają znamienne różnice przepływu zarejestrowane w obrębie brzegu owrzodzenia oraz tkanki prawidłowej w obrębie grup otrzymujących te same preparaty farmakologiczne.

Porównanie średniej wartości przepływu mikrokrążeniowego w brzegu owrzodzenia policzka oraz zdrowej błonie śluzowej policzka 120 min po ekspozycji na kwas octowy.



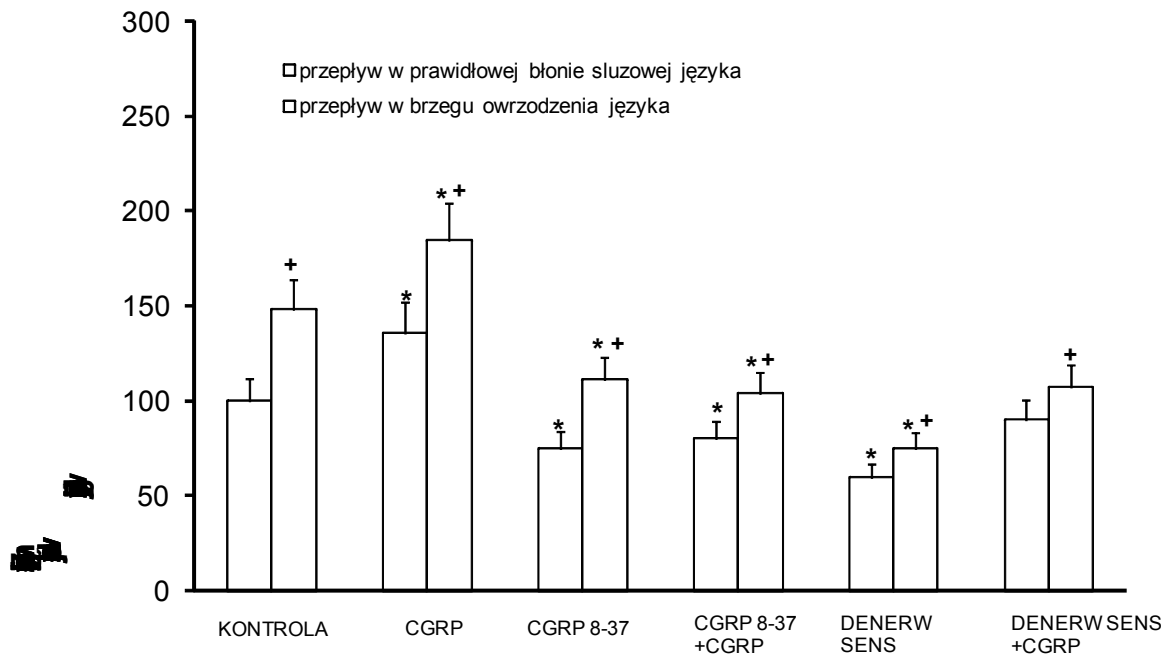
Ryc. 16 przedstawia średnią wartość przepływu mikrokrążeniowego krwi zarejestrowanego w brzegu owrzodzenia oraz w obrębie zdrowej błony śluzowej na powierzchni policzka 120 minut po jej ekspozycji na działanie 70% kwasu octowego. Kontrolę stanowią zwierzęta nie otrzymujące preparatów farmakologicznych. Przepływ mikrokrążeniowy rejestrowano w grupach zwierząt otrzymujących CGRP (50 mg/kg i.p.), bloker receptorów CGRP₁ (CGRP₈₋₃₇ 50mg/kg i.p.), CGRP po zastosowaniu blokera receptorów CGRP₁ (CGRP₈₋₃₇ 50mg/kg i.p.), oraz u zwierząt po zastosowaniu chronicznej denerwacji sensorycznej przez aplikacje neurotoksyny – kapsaicyny, bez, oraz po podaniu CGRP (50 mg/kg i.p.), odnerwienia dokonano sposobem opisanym w rozdziale metodyka. Przedstawione wyniki stanowią średnią uzyskaną w grupach n = 8 zwierząt. Gwiazdki oznaczają znamienne statystycznie różnicę średniej wartości przepływu w porównaniu do zarejestrowanego w grupie kontrolnej (za wartość kontrolną przyjęto średni przepływ mikrokrążeniowy rejestrowany w prawidłowej błonie śluzowej). Krzyżyki oznaczają znamienne różnice przepływu zarejestrowane w obrębie brzegu owrzodzenia w obrębie grup otrzymujących te same preparaty farmakologiczne w porównaniu z prawidłową błoną śluzową.

Średnia wartość przepływu mikrokrążeniowego w brzegu owrzodzenia języka i policzka 120 min po ekspozycji na kwas octowy – porównanie.



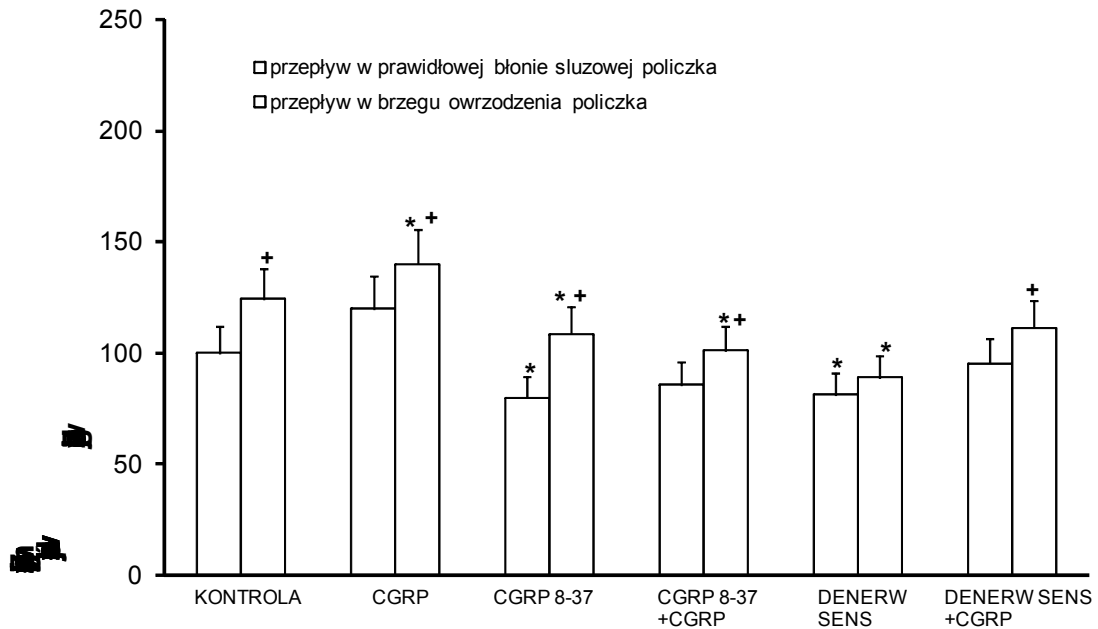
Ryc. 17 przedstawia średnią wartość przepływu mikrokrążeniowego krwi zarejestrowanego w brzegu owrzodzenia na powierzchni języka i policzka 120 minut po ekspozycji błony śluzowej na działanie 70% kwasu octowego. Kontrolę stanowią zwierzęta nie otrzymujące preparatów farmakologicznych. Przepływ mikrokrążeniowy rejestrowano w grupach zwierząt otrzymujących CGRP (50 mg/kg i.p.), bloker receptorów $CGRP_1$ (CGRP₈₋₃₇ 50mg/kg i.p.), CGRP po zastosowaniu blokera receptorów $CGRP_1$ (CGRP₈₋₃₇ 50mg/kg i.p.), oraz u zwierząt po zastosowaniu chronicznej denerwacji sensorycznej przez aplikacje neurotoksyny - kapsaicyny bez oraz po podaniu CGRP (50 mg/kg i.p.), odnerwienia dokonano sposobem opisanym w rozdziale metodyka. Przedstawione wyniki stanowią średnią uzyskaną w grupach = 8 zwierząt. Gwiazdki oznaczają znamienne statystycznie różnicę średniej wartości przepływu w porównaniu do zarejestrowanego w grupie kontrolnej. Krzyżyki oznaczają znamienne różnicę przepływu w obrębie brzegu owrzodzeń na policzku i języku w obrębie grup otrzymujących te same preparaty farmakologiczne.

Porównanie średniej wartości przepływu mikrokrążeniowego w brzegu owrzodzenia języka oraz zdrowej błonie śluzowej języka 7 dni po ekspozycji na kwas octowy.



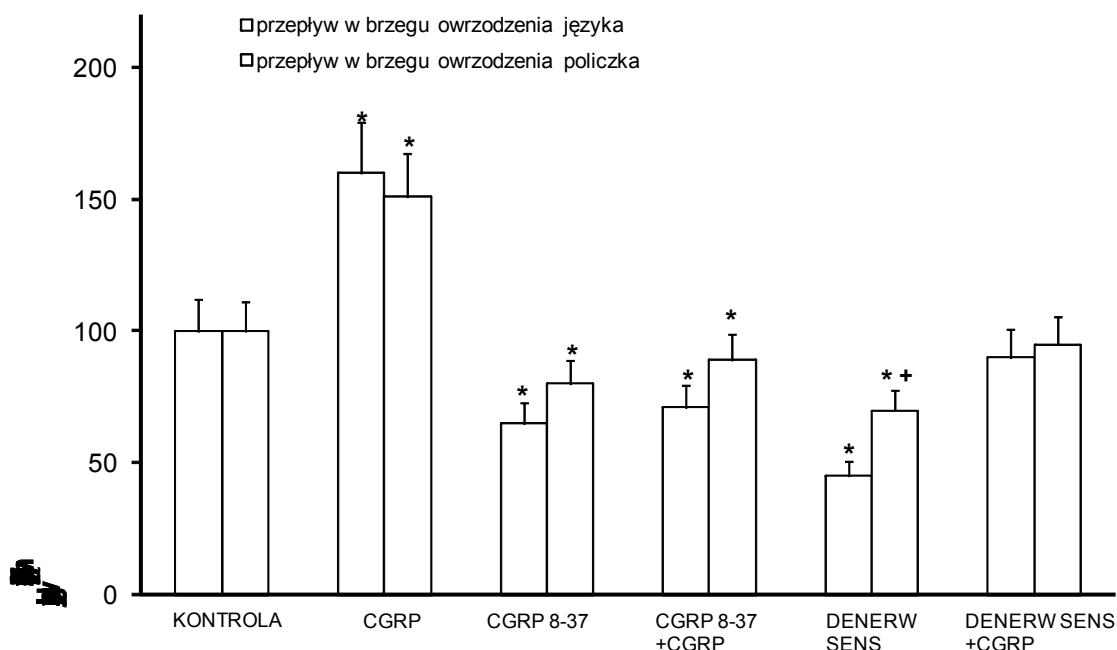
Ryc.18 przedstawia średnią wartość przepływu mikrokrążeniowego krwi zarejestrowanego w brzegu owrzodzenia oraz w obrębie zdrowej błony śluzowej na powierzchni języka 120 minut po jej ekspozycji na działanie 70% kwasu octowego. Kontrolę stanowią zwierzęta nie otrzymujące preparatów farmakologicznych. Przepływ mikrokrążeniowy rejestrowano w grupach zwierząt otrzymujących CGRP (50 mg/kg i.p.), bloker receptorów CGRP₁ (CGRP₈₋₃₇ 50mg/kg i.p.), CGRP po zastosowaniu blokera receptorów CGRP₁ (CGRP₈₋₃₇ 50mg/kg i.p.), oraz u zwierząt po zastosowaniu chronicznej denerwacji sensorycznej przez aplikacje neurotoksyny - kapsaicyny bez oraz po podaniu CGRP (50 mg/kg i.p.), odnerwienia dokonano sposobem opisanym w rozdziale metodyka. Przedstawione wyniki stanowią średnią uzyskaną w grupach n = 8 zwierząt. Gwiazdki oznaczają znamienne statystycznie różnicę średniej wartości przepływu w porównaniu do zarejestrowanego w grupie kontrolnej (za wartość kontrolną przyjęto średni przepływ mikrokrążeniowy rejestrowany w prawidłowej błonie śluzowej). Krzyżyki oznaczają znamienne różnice przepływu zarejestrowane w obrębie brzegu owrzodzenia oraz tkanki prawidłowej w obrębie grup otrzymujących te same preparaty farmakologiczne.

Porównanie średniej wartości przepływu mikrokrążeniowego w brzegu owrzodzenia policzka oraz zdrowej błonie śluzowej policzka 7 dni po ekspozycji na kwas octowy.



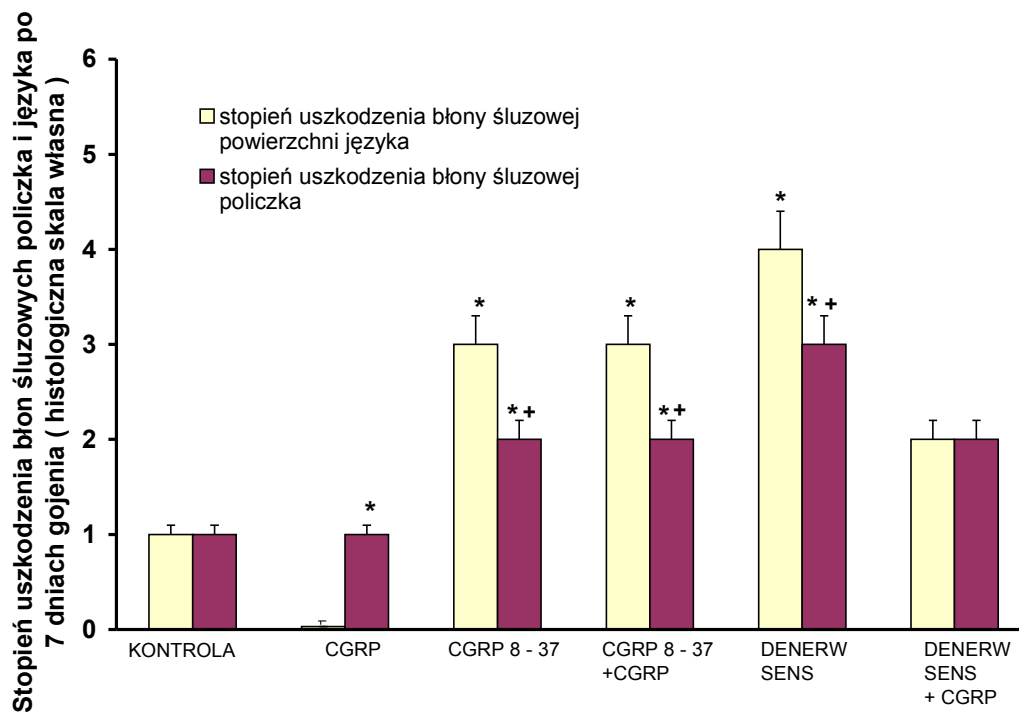
Ryc. 19 przedstawia średnią wartość przepływu mikrokrążeniowego krwi zarejestrowanego w brzegu owrzodzenia oraz w obrębie zdrowej błony śluzowej na powierzchni policzka 120 minut po jej ekspozycji na działanie 70% kwasu octowego. Kontrolę stanowią zwierzęta nie otrzymujące preparatów farmakologicznych. Przepływ mikrokrążeniowy rejestrowano w grupach zwierząt otrzymujących CGRP (50 mg/kg i.p.), bloker receptorów CGRP₁ (CGRP₈₋₃₇ 50mg/kg i.p.), CGRP po zastosowaniu blokera receptorów CGRP₁ (CGRP₈₋₃₇ 50mg/kg i.p.), oraz u zwierząt po zastosowaniu chronicznej denerwacji sensorycznej przez aplikacje neurotoksyny - kapsaicyny bez oraz po podaniu CGRP (50 mg/kg i.p.), odnerwienia dokonano sposobem opisanym w rozdziale metodyka. Przedstawione wyniki stanowią średnią uzyskaną w grupach n = 8 zwierząt. Gwiazdki oznaczają znamienne statystycznie różnice średniej wartości przepływu w porównaniu do zarejestrowanego w grupie kontrolnej (za wartość kontrolną przyjęto średni przepływ mikrokrążeniowy rejestrowany w prawidłowej błonie śluzowej). Krzyżyki oznaczają znamienne różnice przepływu zarejestrowane w obrębie brzegu owrzodzenia oraz tkanki zdrowej w obrębie grup otrzymujących te same preparaty farmakologiczne.

Średnia wartość przepływu mikrokrążeniowego w brzegu owrzodzenia języka i policzka w 7 dniu gojenia po ekspozycji na kwas octowy – porównanie.



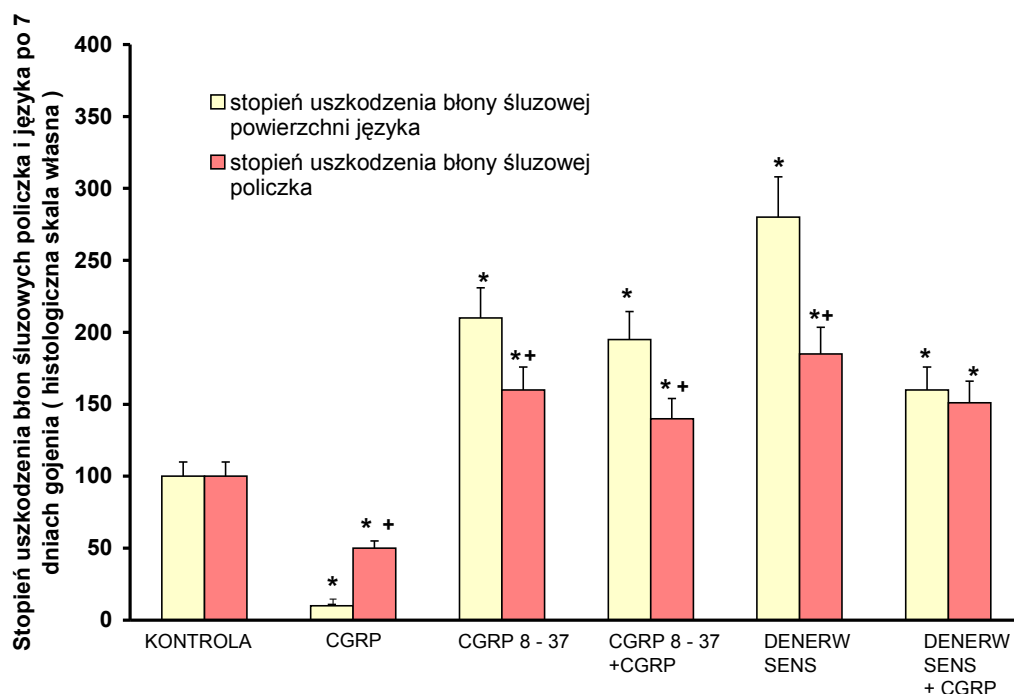
Ryc. 20 przedstawia średnią wartość przepływu mikrokrążeniowego krwi zarejestrowanego w brzegu owrzodzenia na powierzchni języka i policzka w 7 dniu gojenia po ekspozycji błony śluzowej na działanie 70% kwasu octowego. Kontrolę stanowią zwierzęta nie otrzymujące preparatów farmakologicznych. Przepływ mikrokrążeniowy rejestrowano w grupach zwierząt otrzymujących CGRP (50 mg/kg i.p.), bloker receptorów CGRP₁ (CGRP₈₋₃₇ 50mg/kg i.p.), CGRP po zastosowaniu blokera receptorów CGRP₁ (CGRP₈₋₃₇ 50mg/kg i.p.), oraz u zwierząt po zastosowaniu chronicznej denerwacji sensorycznej przez aplikacje neurotoksyny - kapsaicyny bez oraz po podaniu CGRP (50 mg/kg i.p.), odnerwienia dokonano sposobem opisanym w rozdziale metodyka. Przedstawione wyniki stanowią średnią uzyskaną w grupach n = 8 zwierząt. Gwiazdki oznaczają znamienne statystycznie różnicę średniej wartości przepływu w porównaniu do zarejestrowanego w grupie kontrolnej. Krzyżyki oznaczają znamienne różnicę przepływu w obrębie brzegu owrzodzeń na policzku i języku w obrębie grup otrzymujących te same preparaty farmakologiczne.

Stopień uszkodzenia błony śluzowej języka i policzka w 7 dniu gojenia oceniany przy zastosowaniu histologicznej skali własnej.



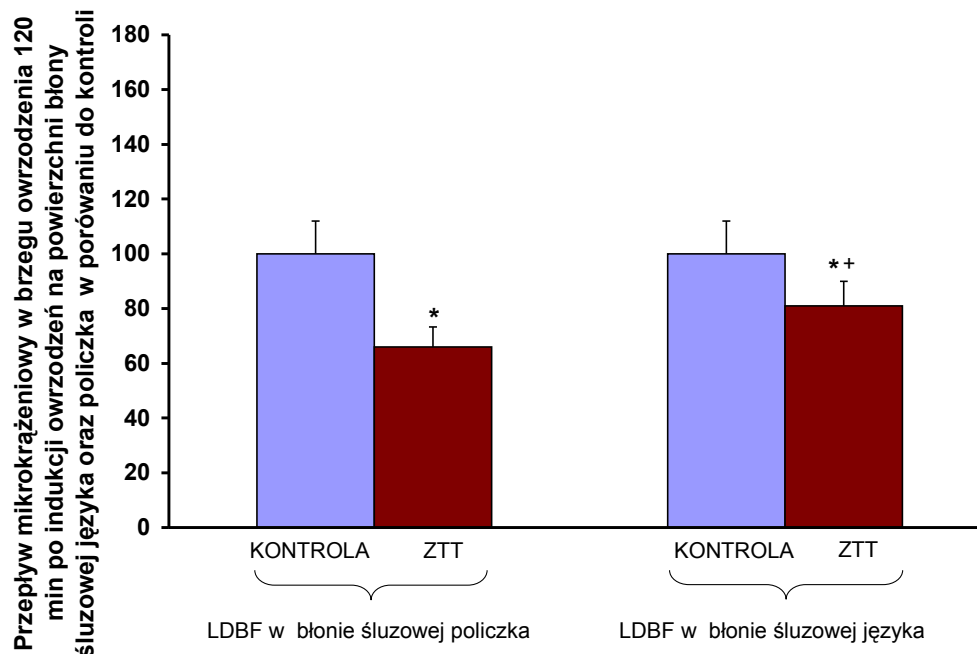
Ryc. 21 przedstawia średni stopień uszkodzenia błony śluzowej języka i policzka oceniony za pomocą histologicznej skali własnej. Kontrolę stanowią zwierzęta nie otrzymujące preparatów farmakologicznych. Przepływ mikrokraźeniowy rejestrowano w grupach zwierząt otrzymujących CGRP (50 mg/kg i.p.), bloker receptorów CGRP_1 (CGRP_{8-37} 50mg/kg i.p.), CGRP po zastosowaniu blokera receptorów CGRP_1 (CGRP_{8-37} 50mg/kg i.p.), oraz u zwierząt po zastosowaniu chronicznej denerwacji sensorycznej przez aplikacje neurotoksyny - kapsaicyny bez oraz po podaniu CGRP (50 mg/kg i.p.), odnerwienia dokonano sposobem opisanym w rozdziale metodyka. Przedstawione wyniki stanowią średnią uzyskaną w grupach $n = 8$ zwierząt. Gwiazdki oznaczają znamiennej statystycznie różnicę średniego stopnia uszkodzenia błony śluzowej w porównaniu do określonego w grupie kontrolnej. Krzyżyki oznaczają znamiennej różnicę stopnia uszkodzenia błony śluzowej policzka i języka w obrębie grup otrzymujących te same preparaty farmakologiczne.

Porównanie średniej wielkości powierzchni owrzodzenia błony śluzowej języka i policzka w 7 dniu gojenia po ekspozycji na kwas octowy.



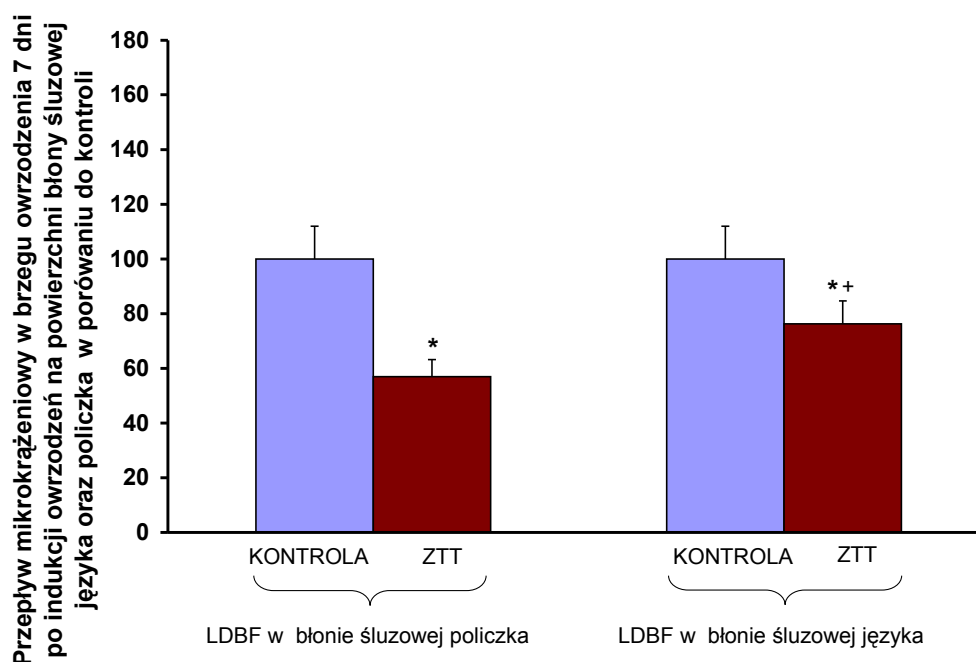
Ryc. 22 przedstawia porównanie średniej wartości powierzchni owrzodzeń na powierzchni języka oraz policzka w 7 dniu gojenia po ekspozycji błony śluzowej na działanie 70% kwasu octowego. Kontrolę stanowią zwierzęta nie otrzymujące preparatów farmakologicznych. Powierzchnie owrzodzeń błony śluzowej policzka i języka rejestrowano w grupach zwierząt otrzymujących CGRP (50 mg/kg i.p.), bloker receptorów CGRP_1 (CGRP₈₋₃₇ 50mg/kg i.p.), CGRP po zastosowaniu blokera receptorów CGRP_1 (CGRP₈₋₃₇ 50mg/kg i.p.), oraz u zwierząt po zastosowaniu chronicznej denerwacji sensorycznej przez aplikacje neurotoksyny - kapsaicyny bez oraz po podaniu CGRP (50 mg/kg i.p.), odnerwienia dokonano sposobem opisanym w rozdziale metodyka. Przedstawione wyniki stanowią średnią uzyskaną w grupach n = 8 zwierząt. Za pomocą gwiazdek oznaczono znamienne statystycznie różnice średniej wielkości powierzchni owrzodzenia w porównaniu do zarejestrowanego w grupie kontrolnej. Krzyżyki oznaczają znamienne różnice średniej wielkości powierzchni owrzodzeń na policzku i języku w obrębie grup otrzymujących te same preparaty farmakologiczne.

Średnia wartość przepływu mikrokraźniowego w brzegu owrzodzenia języka i policzka 120 min po ekspozycji na kwas octowy u zwierząt z ograniczonym przepływem tkankowym, kontrolę stanowią zwierzęta o prawidłowym przepływie krwi.



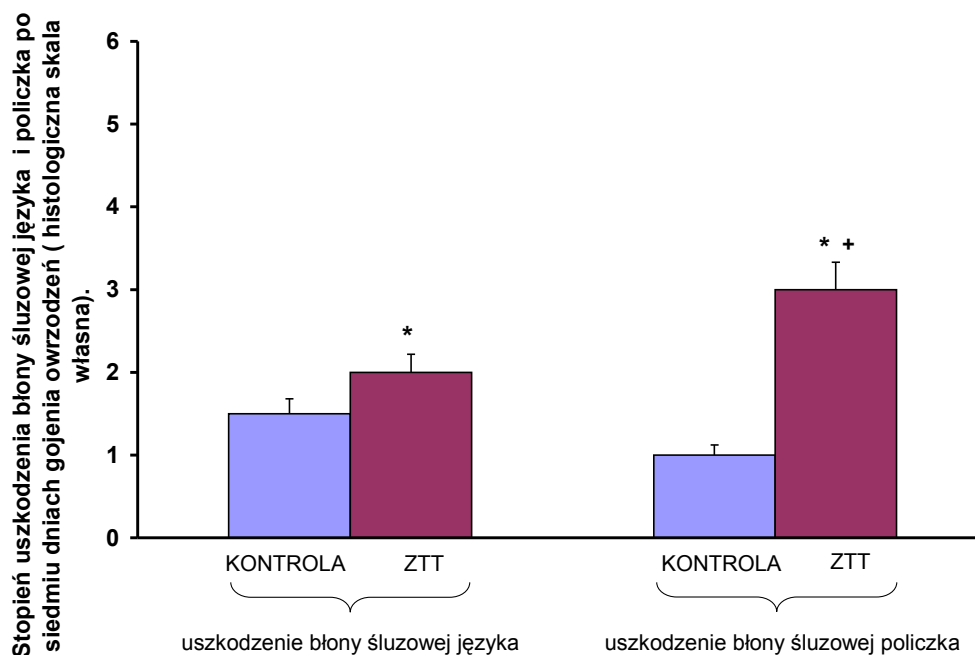
Ryc. 23 przedstawia średnią wartość przepływu mikrokraźniowego krwi zarejestrowanego w brzegu owrzodzenia na powierzchni języka i policzka 120 minut po ekspozycji błony śluzowej na działanie 70% kwasu octowego u zwierząt z ograniczonym przepływem tkankowym na skutek częściowej okluzji (około 60%) tętnicy szyjnej. Kontrolę stanowią zwierzęta o prawidłowym przepływie krwi, nie otrzymujące preparatów farmakologicznych. Przedstawione wyniki stanowią średnią uzyskaną w grupach n = 8 zwierząt. Za pomocą gwiazdek oznaczono znamienne statystycznie różnice wartości przepływu w porównaniu do zarejestrowanego w grupie kontrolnej. Krzyżyk oznacza znamienne różnicę przepływu w obrębie brzegu owrzodzeń na policzku i języku w grupie zwierząt, u których ograniczono przepływ krwi.

Średnia wartość przepływu mikrokrążeniowego w brzegu owrzodzenia języka i policzka w 7 dniu gojenia owrzodzeń u zwierząt z ograniczonym przepływem tkankowym, kontrolę stanowią zwierzęta o prawidłowym przepływie krwi.



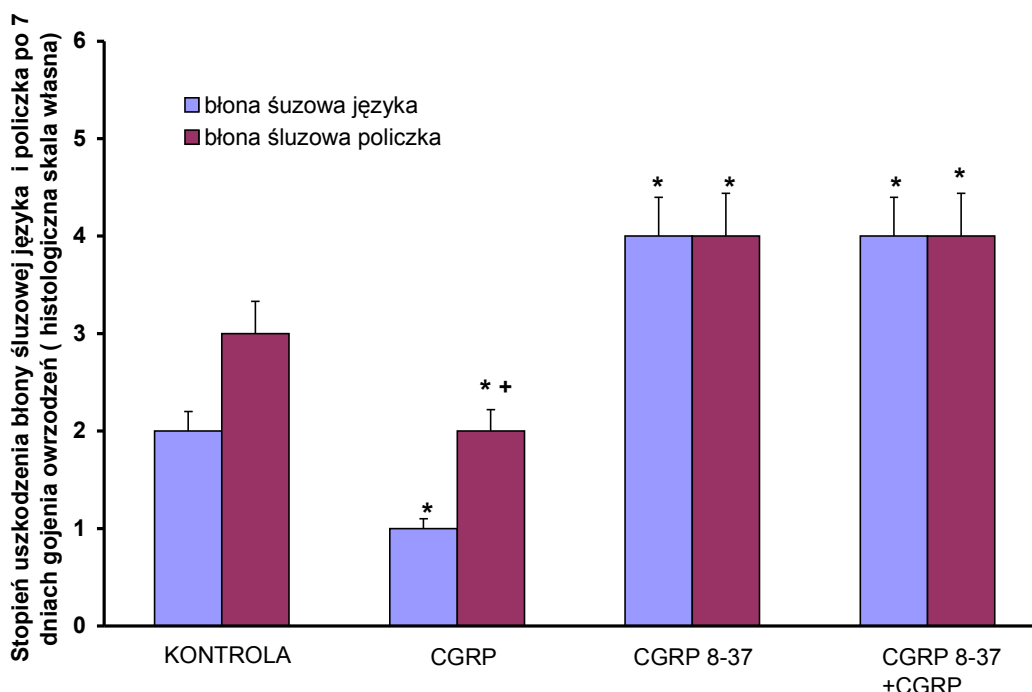
Ryc. 24 przedstawia średnią wartość przepływu mikrokrążeniowego krwi zarejestrowanego w brzegu owrzodzenia na powierzchni języka i policzka w 7 dniu gojenia owrzodzeń po ekspozycji błony śluzowej na działanie 70% kwasu octowego u zwierząt z ograniczonym przepływem tkankowym na skutek częściowej okluzji (około 60%) tętnicy szyjnej. Kontrolę stanowią zwierzęta o prawidłowym przepływie krwi, nie otrzymujące preparatów farmakologicznych. Przedstawione wyniki stanowią średnią uzyskaną w grupach $n = 8$ zwierząt. Za pomocą gwiazdek oznaczono znamienne statystycznie różnice wartości przepływu w porównaniu do zarejestrowanego w grupie kontrolnej. Krzyżyk oznacza znamienne różnicę przepływu w obrębie brzegu owrzodzeń na policzku i języku w grupie zwierząt, u których ograniczono przepływ krwi.

Stopień uszkodzenia błony śluzowej języka i policzka oceniany za pomocą histologicznej skali własnej w 7 dniu gojenia po ekspozycji na kwas octowy u zwierząt z ograniczonym przepływem tkankowym, kontrolę stanowią zwierzęta o prawidłowym przepływie krwi.



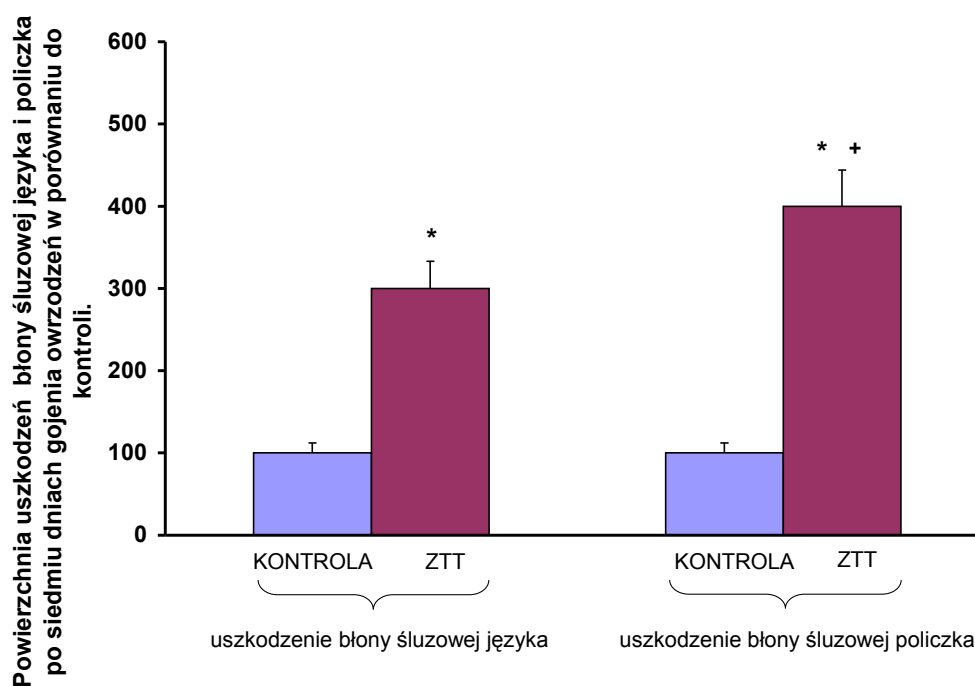
Ryc. 25 przedstawia stopień uszkodzenia błony śluzowej języka i policzka oceniany za pomocą histologicznej skali własnej w 7 dniu gojenia po ekspozycji błony śluzowej na działanie 70% kwasu octowego u zwierząt z ograniczonym przepływem tkankowym na skutek częściowej okluzji (około 60%) tętnicy szyjnej. Kontrolę stanowią zwierzęta o prawidłowym przepływie krwi, nie otrzymujące preparatów farmakologicznych. Przedstawione wyniki stanowią średnią uzyskaną w grupach $n = 8$ zwierząt. Za pomocą gwiazdek oznaczono znamienne statystycznie różnice stopnia uszkodzenia błony śluzowej w porównaniu do zarejestrowanego w grupie kontrolnej. Krzyżyk oznacza znamienne różnice stopnia uszkodzenia błony śluzowej policzka i języka w grupie zwierząt, u których ograniczono przepływ krwi.

Stopień uszkodzenia błony śluzowej języka i policzka w 7 dniu gojenia u zwierząt z ograniczonym przepływem tkankowym oceniany przy zastosowaniu histologicznej skali własnej.



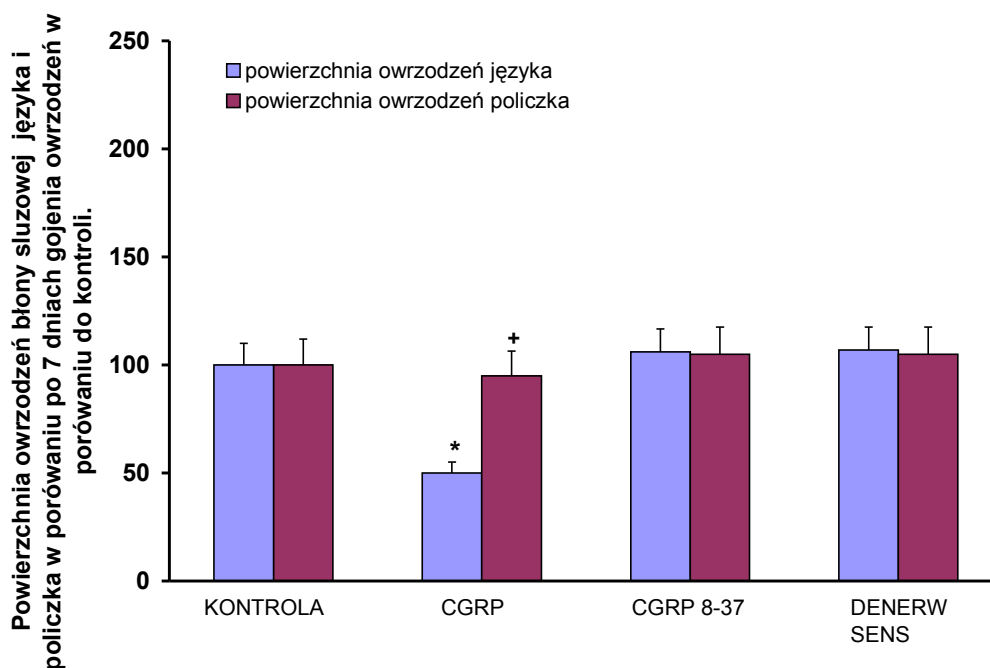
Ryc. 26 przedstawia średni stopień uszkodzenia błony śluzowej języka i policzka w 7 dniu gojenia owrzodzeń oceniony za pomocą histologicznej skali własnej. Kontrolę stanowią zwierzęta nie otrzymujące preparatów farmakologicznych. Przepływ mikrokrażeńowy rejestrowano w grupach zwierząt otrzymujących CGRP (50 mg/kg i.p.), bloker receptorów CGRP₁ (CGRP₈₋₃₇ 50mg/kg i.p.) oraz neurotoksynę - kapsaicynę (2, 5, 10 i 50 mg/72h). Przedstawione wyniki stanowią średnią uzyskaną w grupach n = 8 zwierząt. Za pomocą gwiazdek oznaczono znamienne statystycznie różnice stopnia uszkodzenia błony śluzowej w porównaniu do zarejestrowanego w grupie kontrolnej. Krzyżyk oznacza znamienne różnicę stopnia uszkodzenia błony śluzowej policzka i języka, w grupie zwierząt, u których ograniczono przepływ krwi.

Powierzchnia owrzodzeń błony śluzowej policzka i języka u zwierząt z ograniczonym przepływem tkankowym w porównaniu do kontroli. Kontrolę stanowią zwierzęta o prawidłowym przepływie krwi.



Ryc. 27 przedstawia zmianę powierzchni owrzodzeń (% w porównaniu do kontroli) oceniany planimetrycznie w 7 dniu gojenia po ekspozycji błony śluzowej na działanie 70% kwasu octowego u zwierząt z ograniczonym przepływem tkankowym. Kontrolę stanowią zwierzęta o prawidłowym przepływie krwi, nie otrzymujące preparatów farmakologicznych. Przepływ tkankowy został ograniczony przez około 60% okluzję tętnicy szyjnej. Przedstawione wyniki stanowią średnią uzyskana w grupach n = 8 zwierząt. Gwiazdka oznacza znamienne różnie w porównaniu do kontroli. Krzyżyk oznacza znamienne różnie wartości pomiędzy wielkością uszkodzeń na języku i policzku w obrębie grupy zwierząt z ograniczonym przepływem tkankowym.

Powierzchnia owrzodzeń błony śluzowej języka i policzka u zwierząt z ograniczonym przepływem tkankowym w porównaniu do kontroli. Kontrolę stanowią zwierzęta nie otrzymujące preparatów farmakologicznych.



Ryc. 28 przedstawia zmianę powierzchni owrzodzeń błony śluzowej języka i policzka (% w porównaniu do kontroli) oceniany planimetrycznie w 7 dniu gojenia po ekspozycji błony śluzowej na działanie 70% kwasu octowego u zwierząt z ograniczonym przepływem tkankowym. Kontrolę stanowią zwierzęta nie otrzymujące preparatów farmakologicznych. Przepływ mikrokrażeniowy rejestrowano w grupach zwierząt otrzymujących CGRP (50 mg/kg i.p.), bloker receptorów CGRP₁ (CGRP₈₋₃₇ 50mg/kg i.p.) oraz neurotoksyny - kapsaicyny (2, 5, 10 i 50 mg/72h). Przedstawione wyniki stanowią średnią uzyskaną w grupach n = 8 zwierząt. Gwiazdka oznacza znamienne różnice w porównaniu do kontroli. Krzyżyk oznacza znamienne różnice wartości pomiędzy wielkością uszkodzeń na języku i policzku w obrębie grup z ograniczonym przepływem tkankowym.

5. DYSKUSJA

Błona śluzowa przewodu pokarmowego odgrywa bez wątpienia najważniejszą rolę w utrzymaniu homeostazy organizmów zwierząt wyższych i człowieka. Ogromna powierzchnia tej błony stanowi niezwykle precyzyjną barierę oraz miejsce intensywnego, bardzo dokładnie kontrolowanego kontaktu organizmu z otaczającym środowiskiem zewnętrznym. Błona ta dzięki jej niezwykłym morfologicznym i funkcjonalnym cechom oraz złożonym mechanizmom lokalnej i ogólnej regulacji z wielką precyzją i selektywnością umożliwia wprowadzenie do środowiska wewnętrznego wody, elektrolitów, witamin i substratów budulcowych oraz energetycznych. Błona śluzowa jest też miejscem eliminacji z organizmu wielu produktów metabolizmu. Jej selektywność w kontaktach organizmu z mikrokosmosem jest zapewniona przez barierę immunologiczną, która jest doskonale rozwinięta. Powyższe zadania homeostatyczne są wypełniane poprzez fizjologiczną aktywność błony związanej z procesami wydzielania, trawienia oraz wchłaniania.

O ogromnej roli błony śluzowej przewodu pokarmowego w utrzymaniu stałości środowiska wewnętrznego świadczy fakt istnienia precyzyjnych mechanizmów kontroli jej funkcji. Mechanizmy nerwowej kontroli funkcji błony śluzowej związane są z istnieniem niezwykle intensywnego unerwienia receptorów i jej efektorów przez śródściennie sieci neuronalne nieadrenergiczne, niecholinergiczne i sensoryczne, które wspólnie z unerwieniem zewnątrzpochodnym tworzą oś mózgowo – jelitową. Oś ta jest najprecyzyjniejszym mechanizmem dostarczania informacji niezbędnych do kontroli czynności efektorów wydzielniczych i ruchowych w narządzie obwodowym, jakim jest przewód pokarmowy a zwłaszcza jego błona śluzowa. Należy również podkreślić, że funkcje błony śluzowej związane z jej homeostatycznymi zadaniami są kontrolowane przez lokalne i ogólne mechanizmy hormonalnej natury, które są zintegrowane z regulacją nerwową.

Te niezwykle odpowiedzialne zadania błona śluzowa może wypełniać dzięki właściwemu zabezpieczeniu własnych potrzeb metabolicznych i mechanizmów transportu do i od błony po stronie płynu tkankowego. Oczywistym zatem jest fakt, że to lokalny przepływ krwi dostosowany do aktualnej aktywności metabolicznej, transportowej i immunologicznej determinuje jej homeostatyczne zadania.

Błona śluzowa przewodu pokarmowego ma zróżnicowaną morfologię i czynności w zależności od jej lokalizacji.

We wstępie niniejszej rozprawy dość szczegółowo przedstawiono aktualną wiedzę dotyczącą fizjologii i patologii błony śluzowej jamy ustnej, której regulacja ukrwienia oraz relacja przepływu krwi z procesami gojenia uszkodzeń była istotą wykonanych badań. Należy podkreślić, że błona śluzowa, wyściełająca jamę ustną ma szczególne znaczenie. Rola błony śluzowej jamy ustnej w zasadzie jest taka sama jak w innych odcinkach przewodu pokarmowego, jednak proporcje pomiędzy zakresami jej czynności są odmienne niż w dalszych odcinkach tego układu. Przede wszystkim błona śluzowa jamy ustnej i języka ma doskonałe somatycznie unerwienie czuciowe, które sprawia, że istnieje świadoma ocena i kontrola pokarmu, płynu i innych elementów środowiska zewnętrznego wprowadzonych do tego początkowego odcinka przewodu pokarmowego. Ocena ta dotyczy takich cech jak przydatność lub też szkodliwość lokalna i ogólna.

Z uwagi na szczególną rolę jamy ustnej obejmującą jej „pierwszy” kontakt ze środowiskiem zewnętrznym, staje się ona odcinkiem przewodu pokarmowego szczególnie narażonym na uszkodzenia o różnej genezie. Dlatego też błona śluzowa jamy ustnej posiada wspomniane już wcześniej mechanizmy protekcyjne oraz zdolność do intensywnej regeneracji. Lokalne czynniki uszkadzające o znacznej sile patogennej uszkadzają błonę śluzową jamy ustnej w czasie zdrowia. Błona ta jest też łatwo uszkadzana przez słabe patogeny przy współistnieniu wielu schorzeń systemowych. Wtedy to dochodzi do powstania nadżerek i owrzodzeń błony śluzowej w różnych miejscach jamy ustnej, co w efekcie prowadzi do zaburzenia homeostatycznych zadań tej części przewodu pokarmowego.

Przepływ krwi przez każde łożysko naczyniowe zależy od wartości ciśnienia napędowego i oporu przepływu. Ciśnienie napędowe zależy zaś od wartości tętniczego i żylnego ciśnienia krwi, związane jest z ogólną hemodynamiką układu sercowo – naczyniowego. Opór przepływu zależy głównie od promienia naczyń i lepkości krwi. Jeśli ogólne warunki hemodynamiczne są względnie stałe to lokalny narządowy przepływ krwi zależy od lokalnego oporu przepływu, czyli głównie od szerokości naczyń krwionośnych, ponieważ lepkość krwi nie ulega gwałtownym zmianom i tylko w niektórych stanach patologicznych znacznie się zmienia. Szerokość naczyń krwionośnych zależy głównie od aktywności skurczowej mięśni gładkich obecnych w

ich ścianach. Mięśnie te kurcząc się lub rozkurczając, czynnie zmieniają szerokość naczyń i w rezultacie ilość przepływającej przez nie krwi.

Lokalny narządowy przepływ krwi zależy od szeregu fizycznych, chemicznych i nerwowych czynników oddziałujących na mięśnie gładkie ścian naczyń. Niektóre z tych czynników odgrywają rolę w kontroli przepływu krwi, która w każdym łożysku naczyniowym posiada podobną ogólną charakterystykę. Większość obszarów naczyniowych dysponuje specyficznymi, własnymi regulatorami przepływu krwi, które zabezpieczają ich funkcjonalne potrzeby. Odmienne są zwłaszcza mechanizmy odpowiedzialne za istnienie ujemnego sprzężenia zwrotnego między aktywnością mięśni gładkich ścian naczyń oporowych przedwłosowatych i pozawłosowatych oraz zwieraczy przedwłosniczkowych a aktywnością metaboliczną komórek zlokalizowanych w ich sąsiedztwie. Analiza elementów pętli tego sprzężenia ujemnego determinującego makro – i mikrokraźeniowy przepływ krwi jest jednym z fundamentalnych problemów badawczych dotyczących krążenia narządowego.

Kraźnienie śluzówkowe jamy ustnej jest złożonym obszarem naczyniowym, którego naturalne mechanizmy kontrolne nieustannie dostosowują przepływ krwi i ukrwienie do aktualnych funkcjonalnych i metabolicznych potrzeb tej błony.

Podstawowa kwestia, która miała być wyjaśniona w rezultacie niniejszych badań to rola unerwienia sensorycznego przez włókna bezmielinowe typu C w kontroli śluzówkowego mikrokraźenia w jamie ustnej szczura w warunkach prawidłowych. Ponadto celem badań było określenie udziału unerwienia sensorycznego błony śluzowej policzka i języka w dynamice gojenia doświadczonego jej uszkodzenia oraz wykazanie ewentualnego związku pomiędzy ukrwieniem błony śluzowej a procesem jej gojenia.

Zastosowanie w niniejszych badaniach neurotoksyny, jaką jest kapsaicyna pozwoliło na uzyskanie dowodów wskazujących na to, że czuciowe neurony typu C biorą udział w tonicznej kontroli szerokości naczyń błony śluzowej jamy ustnej. Kraźeniowym efektem chronicznej denerwacji sensorycznej była redukcja mikrokraźeniowego przepływu krwi przez błonę śluzową języka i policzka (ryc. 15, 16).

To niedokrwienie jest znamienne i znacznego stopnia oraz utrzymuje się przez cały okres prowadzenia obserwacji. Fenomen ten występuje również w innych obszarach błony śluzowej przewodu pokarmowego (20, 22, 34, 102). Obserwowane niedokrwienie błony śluzowej jest następstwem pozbawienia zakończeń neuronów sensorycznych przekaźnikowych neuropeptydów (17, 72, 98, 100, 101, 203).

Wystąpienie reakcji niedokrwiennej uzupełnia wiedzę dotyczącą roli czuciowych neuronów w kontroli szerokości naczyń błony śluzowej jamy ustnej, wskazuje ona na toniczne, naczyniorozszerzające działanie. Do niedawna uważano, że tylko adrenergiczne nerwy współczulne wykazują toniczną aktywność naczynioruchową, co dotyczyło również błony śluzowej całego przewodu pokarmowego. Wyniki niniejszych badań dowodzą, że w błonie śluzowej jamy ustnej naczynia krwionośne w warunkach podstawowych znajdują się pod tonicznym naczyniorozkurczowym wpływem neuronów sensorycznych a wyeliminowanie tego wpływu prowadzi do skurczu naczyń i niedokrwienia błony śluzowej.

Określenie w przeprowadzanych badaniach roli neuronów sensorycznych w kontroli śluzówkowego przepływu krwi w jamie ustnej, nie wyjaśniło jednak w pełni mechanizmu oddziaływania pomiędzy tymi neuronami a mięśniami gładkimi ścian jednostek mikrokrażeńiowych błony śluzowej. Jednak wyniki wcześniejszych badań dowiodły niewątpliwie, że neurony sensoryczne oddziałują na najbliższe otoczenie przez uwalniane neuroprzekaźniki, którymi są czuciowe neuropeptydy, głównie CGRP, co zostało omówione we wstępie do niniejszej dysertacji.

Opierając się na dotychczasowej wiedzy dotyczącej natychmiastowych krażeńiowych efektów kapsaicyny stosowanej miejscowo na błonie śluzowej należy stwierdzić, że wywołuje ona wzrost lokalnego przepływu krwi (1, 60, 89, 207) w następstwie rozszerzania naczyń oporowych. Neurotoksyna ta w początkowym okresie działania na neurony czuciowe doprowadza bowiem do lawinowego uwalniania z nich neuropeptydów naczyniorozszerzających, głównie CGRP.

Ten bezpośredni efekt naczyniowy działania kapsaicyny jest odpowiednikiem naturalnego pobudzania zakończeń czuciowych, jakie ma miejsce w warunkach fizjologicznych bądź też patologicznych. Pobudzenie neuronów czuciowych błony śluzowej jamy ustnej a ściślej ich zakończeń zlokalizowanych w pobliżu naczyń krwionośnych może mieć swą przyczynę w samej błonie śluzowej, bądź też w obecnych tam chemo – i/lub mechanoreceptorach. Obecność w błonie śluzowej receptorów, których pobudzenie aktywuje zlokalizowane tam włókna sensoryczne tworzy miejscowy, wewnątrz śluzówkowy układ homeostatyczny, który w istotny sposób moduluje szerokość naczyń krwionośnych i tym samym przepływ krwi w zależności od fizyko – chemicznego oddziaływania treści jamy ustnej na błonę śluzową.

W niniejszych badaniach nie analizowano natychmiastowych efektów mikrokrażeńiowych lokalnego naśluzówkowego podania kapsaicyny, ponieważ są one

już dobrze poznane (61, 82, 84, 88, 161, 195, 196). Mając jednak na uwadze ewentualne aplikacyjne znaczenie poczynionych obserwacji ocenione zostały efekty działania egzogenego CGRP na badane parametry. CGRP jest głównym neuroprzekaznikiem neuronów sensorycznych, zatem logicznym wydało się użycie tego neuropeptydu do uzyskania precyzyjnych danych o efektach aktywacji i mechanizmie działania neuronów sensorycznych.

W zastosowanym modelu uszkodzenia błony śluzowej jamy ustnej wykazano, iż po 120 minutach od chwili wywołania uszkodzenia w brzegu tak indukowanego owrzodzenia przepływ krwi jest znamienne mniejszy w porównaniu z przepływem kontrolnym, zarówno na błonie śluzowej języka (ryc. 15) jak i policzka (ryc.16). Takie zmiany przepływu śluzówkowego krwi są typowe dla tego modelu doświadczalnego a ich mechanizm został już wyjaśniony w licznych wcześniejszych badaniach (10, 44, 66, 157, 203, 207). Jak już wcześniej wspomniano denerwacja sensoryczna zmniejsza znamienne kontrolny śluzówkowy przepływ krwi i przepływ w brzegu owrzodzenia języka oraz policzka (ryc.17). Stopień zmniejszenia przepływu krwi w brzegu owrzodzenia 120 minut od momentu uszkodzenia jest znamienne większy niż w zdrowej błonie śluzowej (ryc.15, 16). Natomiast w 7 dniu od momentu indukcji uszkodzenia w brzegu owrzodzeń występuje znamienne przekrwienie w porównaniu do zdrowej błony śluzowej (ryc. 18, 19).

Egzogeny CGRP zgodnie z oczekiwaniami wywoływał znaczne przekrwienie zdrowej błony śluzowej oraz w brzegu owrzodzeń zarówno w błonie śluzowej języka i policzka, przy czym po 7 dniach wzrost przepływu w brzegu owrzodzeń przewyższał znamienne stopień tego przyrostu w prawidłowej błonie śluzowej w obu badanych miejscach (ryc.20).

W kolejnych doświadczeniach oceniono udział receptora $CGRP_1$, którego naturalnym agonistą jest CGRP w mediowaniu badanych efektów krążeniowych i roli w dynamice gojenia uszkodzeń błony śluzowej jamy ustnej. Okazało się, że CGRP⁸⁻³⁷ będący antagonistą receptora $CGRP_1$ znamienne zmniejsza przepływ krwi w zdrowej błonie śluzowej jamy ustnej oraz w brzegu owrzodzeń języka i policzka po 120 minutach i po 7 dniach od indukcji uszkodzeń (ryc.17, 20). Takie efekty krążeniowe antagonisty receptorów CGRP potwierdzają istnienie ich tonicznej aktywacji, której wynikiem jest tonicznie utrzymujący się efekt naczyniorozkurczowy zaś ich blokada znosi to działanie. Efektywność blokady receptorów $CGRP_1$ została potwierdzona zniesieniem krążeniowych efektów egzogenego CGRP (ryc.17, 20).

Analiza porównawcza krążeniowych efektów denerwacji sensorycznej i blokady receptorów CGRP₁ wykazała, że krążeniowe efekty denerwacji dotyczące stopnia zmniejszenia śluzówkowego przepływu krwi są znamienne większe niż te obserwowane po zablokowaniu receptorów CGRP₁. Spostrzeżenie to wskazuje, iż neurony sensoryczne błony śluzowej jamy ustnej uwalniają CGRP jako główny przekaźnik a ponadto uwalniają jeszcze inny lub inne czynniki naczyniorozszerzające, które działają przez inne receptory. Wielce prawdopodobnym wydaje się, iż tym neuroprzekaźnikiem jest SP (76, 121, 124, 184, 186, 187, 192, 193).

Istotnych i ciekawych informacji dostarcza porównanie zmian śluzówkowego przepływu w brzegu uszkodzeń języka i policzka po 120 min i 7 dniach od ich wywołania. Okazało się, że denerwacja sensoryczna redukuje przepływ znamienne bardziej w brzegu owrzodzenia języka niż w brzegu owrzodzenia policzka niezależnie od okresu pomiaru. Ponadto egzogenny CGRP znacznie bardziej zwiększa przepływ krwi w brzegu owrzodzenia języka niż w brzegu owrzodzenia policzka (ryc.17,20). To ostatnie spostrzeżenie zdaje się wskazywać, że błona śluzowa języka posiada większą gęstość unerwienia sensorycznego i receptorów CGRP₁ niż błona śluzowa policzka. Obserwacja ta może zatem tłumaczyć fakt, że błona śluzowa języka jest mniej podatna na uszkodzenia i cechuje się większą dynamiką gojenia (ryc.21, 22).

Istotnym celem niniejszych badań była również próba wyjaśnienia roli neuronów sensorycznych w fenomenie protekcji i restytucji uszkodzonej błony śluzowej jamy ustnej.

Badania nad stanem zapalnym towarzyszącym chorobom przyzębia oraz próby ograniczania bólów zębopochodnych pozwoliły szczegółowo scharakteryzować unerwienie czuciowe jamy ustnej. Wielu autorów dowiodło, że w unerwieniu czuciowym jamy ustnej uczestniczą cienkie włókna kapsaicyno - wrażliwe, które stanowią większość w porównaniu z populacją włókien o grubych osłonkach mielinowych (11, 43, 51, 67, 71). Badania prowadzone w celu zrozumienia ich roli fizjologicznej i interakcji z innymi typami unerwienia mają na celu określenie skutecznych sposobów walki z bólem zęba i tkanek przyzębia, które stanowią niejednokrotnie znaczący problem pojawiający się w trakcie i po zakończeniu leczenia uzębienia. Do innych zespołów chorobowych, w których unerwienie czuciowe wydaje się mieć istotną rolę należą choroby przyzębia, gdzie podczas przewlekłego stanu zapalnego zapoczątkowanego przez czynniki mikrobiologiczne dochodzić może do długotrwałego pobudzania włókien czuciowych i uwalniania neuropeptydów, co może

prowadzić do znacznego wzmożenia stanu zapalnego okolicy przyzębia, które jeśli nie zostanie opanowane może powodować utratę uzębienia (16, 44, 134, 135). Badania te dostarczają wiele dowodów wskazujących na istotną rolę unerwienia czuciowego i mediatorów tego unerwienia w utrzymywaniu integralności tkanek jamy ustnej, podobnie jak ma to miejsce w innych odcinkach przewodu pokarmowego.

Pomimo istotnego znaczenia klinicznego i zainteresowania znaczeniem efektów neurogennych w kontroli stanów zapalnych i procesów gojenia w obrębie jamy ustnej, znaczenie włókien czuciowych w procesie gojenia błony śluzowej nie zostało całkiem wyjaśnione. W niniejszej pracy dokonano analizy roli włókien czuciowych w modelu trwającego 7 dni gojenia chemicznie indukowanych, doświadczalnych owrzodzeń błony śluzowej jamy ustnej i języka.

Prace Szolcosanigo i Bartho z końca lat sześćdziesiątych ubiegłego stulecia pokazały i dowiodły, że wyciąg z czerwonej papryki - kapsaicyna (8-methyl-*N*-vanillyl-6-nonenamid) zdolna jest pobudzać włókna czuciowe i stymulować je do uwalniania neuropeptydów, a stosowana w większych dawkach prowadzi także do ich selektywnej degeneracji, co sprawia, że substancja ta stanowi bardzo użyteczne narzędzie farmakologiczne pozwalające badać znaczenie unerwienia czuciowego (17, 72, 98, 100, 101, 203). W niniejszej pracy zastosowano kapsaicynę we wzrastających dawkach w celu stymulacji lub też pozbawienia zwierząt unerwienia sensorycznego. U zwierząt z ablacją sensoryczną obserwowano znacząco słabszy proces regeneracji błony śluzowej objawiający się zwiększeniem powierzchni uszkodzeń i pogorszeniem obrazu histologicznego po 7 dniach gojenia w porównaniu do kontroli. Wyniki tych doświadczeń korelują z obserwacjami badaczy analizującymi znaczenie unerwienia czuciowego w procesie gojenia owrzodzeń w pozostałych odcinkach przewodu pokarmowego jak żołądek, dwunastnica czy jelito cienkie oraz regeneracji gruczołów takich jak wątroba czy trzustka uszkodzanych w modelach eksperymentalnych przez różne substancje chemiczne (20, 22, 34, 102). Mechanizm dowiedzionego w ten sposób znaczenia unerwienia czuciowego w promocji procesów naprawczych nie jest całkiem jasny z uwagi na wielokierunkowe wpływy mediatorów neuropeptydowych uwalnianych z ich zakończeń. W toku wcześniejszych badań nad rolą włókien czuciowych typu C w mechanizmie działania czynników uszkodzających błonę śluzową wykazano, że neuropeptydy uwalniane z zakończeń neuronów czuciowych zdolne są bezpośrednio pobudzać angiogenezę, komórki układu immunologicznego czy fibroblasty (5, 27, 46, 79), jednak w przebiegu doświadczeń *In vivo* ocena tych

bezpośrednich mechanizmów działań neuropeptydów na poziomie komórkowym nie jest możliwa. Analiza zmian śluzówkowego przepływu krwi przeprowadzona w niniejszej pracy, wykazała, że denerwacja sensoryczna prowadzi do redukcji przepływu krwi w brzegu owrzodzenia zarówno w okresie 120 minut po indukcji owrzodzeń - ostrej fazie rozwijającego się zapalenia, jak i po 7 dniach ich gojenia. Obserwacje te są zgodne ze spostrzeżeniami badaczy opisującymi znamiennej redukcję przepływu mikrokrażeńowego jako jeden z efektów odnerwienia czuciowego tkanek przewodu pokarmowego (20, 34, 85, 105, 118, 122).

Badania prowadzone w latach osiemdziesiątych poprzedniego stulecia dowiodły, że za efekty naczyniowe włókien czuciowych odpowiadają neuropeptydy uwalniane z ich zakończeń a zwłaszcza produkt alternatywnego składowania transkrypcyjnego genu kalcytoniny, 36 aminokwasowy peptyd – CGRP, który wykazuje silne lokalne działanie naczyniorozszerzające (44, 52, 61, 134, 186, 193). Nieodwracalne uszkodzenie unerwienia czuciowego a zarazem brak uwalniania naczyniorozszerzających neuropeptydów ogranicza zjawisko przekrwienia czynnościowego obserwowanego w tkankach, w obrębie których zachodzi zjawisko regeneracji (117, 137). Doświadczenia mające na celu poznanie mechanizmów gojenia w różnych odcinkach przewodu pokarmowego dowodzą, że redukcja przepływu mikrokrażeńowego, a tym samym zaburzenie podaży składników odżywczych i tlenu oraz zmniejszone odprowadzanie metabolitów z obszaru niedokrwionego prowadzą do osłabienia procesów regeneracji tkanek (62, 87, 88).

Ponadto bezpośrednich dowodów na zasadnicze znaczenie ukrwienia tkanek w procesie ich regeneracji dostarczyły doświadczenia, w których częściowo sztucznie ograniczono dopływ krwi do jamy ustnej. Wyniki tych doświadczeń jednoznacznie wskazują, że zabieg taki prowadzi do znamiennej redukcji wartości przepływu w strefie brzeżnej – gojenia owrzodzeń zarówno po ich indukcji, jak i w 7 dniu gojenia, co znamiennej zwalnia dynamikę regeneracji błony śluzowej.

Przeprowadzone własne badania dotyczące roli unerwienia sensorycznego w kontroli ukrwienia błony śluzowej policzka i języka dowiodły, iż unerwienie to odgrywa istotną rolę w warunkach fizjologicznych oraz w stanach uszkodzenia błony śluzowej. Wyniki tych obserwacji wskazują, że sensorycznie indukowane zmiany mikrokrażeńa śluzówkowego są głównie odpowiedzialne za stopień uszkodzenia i dynamikę gojenia doświadczalnych uszkodzeń błony śluzowej policzka i języka.

Celem potwierdzenia roli ukrwienia w rozwoju i gojenia się doświadczalnych uszkodzeń przeprowadzono eksperymenty na zwierzętach, u których uprzednio ograniczano mechanicznie ukrwienie jamy ustnej.

U zwierząt tych po siedmiu dniach gojenia nadal obserwowano niezagojone owrzodzenia, których obraz makroskopowy nie był istotnie różny od obrazów kontrolnych. W przypadku owrzodzeń języka w grupach z ograniczonym przepływem mikrokrażeńiowym u zwierząt, u których dokonano selektywnego odnerwienia włókien czuciowych występowało znamienne pogorszenie obrazu histologicznego błony śluzowej i podśluzowej języka, któremu towarzyszyło zmniejszenie przepływu krwi. Wyniki tych doświadczeń wskazują, że pomimo licznych wielokierunkowych lokalnych oddziaływań neuropoeptydów na tkanki, zasadnicze znaczenie dla procesu regeneracji ma ich zdolność do zwiększania przepływu mikrokrażeńiowego w obrębie brzegu owrzodzenia, co pozwala na regenerację w postaci całkowitego odtworzenia ciągłości błony śluzowej i podśluzowej oraz umożliwia regenerację unaczynienia tych warstw.

Niezwykle interesujących obserwacji, które dodatkowo wskazują na istotną rolę ukrwienia w modulacji procesu gojenia dostarczyło porównanie zakresu i dynamiki procesu regeneracji tkanki policzka i języka w grupach z prawidłowym jak i ograniczonym przepływem krwi. Obserwowano, że u zwierząt, u których wcześniej ograniczono ukrwienie tkanek jamy ustnej w obrębie policzka, nie obserwowano różnic obrazu histologicznego i makroskopowego uszkodzeń w porównaniu do kontroli, natomiast analiza obrazu tkanki języka wykazała znamienne pogorszenie obrazu histologicznego w porównaniu do kontroli. Wydaje się, że powyższe obserwacje odzwierciedlają różnice anatomiczne unerwienia błony śluzowej języka i policzka, gdzie w pierwszym przypadku do istotnych komponent wykazujących wpływ naczyniowe należą okołonaczyniowe włókna sympatyczne, a peptydergiczne unerwienie czuciowe odpowiada za rozkurcz zwieraczy prekapilarnych, a tym samym wzmożone ukrwienie zarówno prawidłowych jak i uszkodzonych tkanek (11, 42, 45, 71, 146). W tkance policzka naczyniozwiążająca aktywność włókien sympatycznych równoważona jest nie tylko przez wpływy unerwienia sensorycznego, ale także swoiste oddziaływanie włókien parasympatycznych uwalniających ze swoich zakończeń mediatory naczyniorozszerzające, takie jak Ach oraz VIP (92, 131, 159, 160, 211). Wydaje się, że taki sposób unerwienia policzka odpowiedzialny jest za istotnie mniejszą zależność kontroli szerokości naczyń i tym samym procesu regeneracji jego tkanek od aktywności włókien czuciowych w porównaniu do tkanki języka, co odzwierciedla

mniejszą zależność od odnerwienia sensorycznego. W grupach, w których ograniczano przepływ tkankowy obserwowano odmienne w (porównaniu do zwierząt z zachowanym prawidłowym ukrwieniem) efekty oddziaływania komponent unerwienia autonomicznego. W warunkach sztucznego ograniczenia dopływu krwi, tkanki policzka zostają niedokrwione, a jednym z następstw tego stanu jest ograniczenie podaży tlenu i substancji odżywczych. W sytuacji tej najpewniej przekroczony zostaje próg wydolności procesów regeneracyjnych, co sprawia, że tkanka wykazuje brak reaktywności na selektywną ablację układu sensorycznego, która posiada udowodnione działanie uszkodzające. Tkanka języka otrzymująca obustronne unaczynienie z gałęzi tętnicy językowej i podjęzykowej, która w sytuacji częściowej okluzji tętnicy szyjnej przyjmuje funkcję krążenia obocznego pozostaje w obszarze nieznacznie tylko zmienionego ukrwienia (123, 212) (w przeprowadzonych pomiarach różnice w porównaniu z tkanką zdrową były zamienne, ale istotnie mniejsze niż w przypadku tkanki policzka). Stan taki sprawia, że tkanka języka jest znacznie mniej zależna od częściowej, jednostronnej okluzji tętnic szyjnych. Pomimo, że obraz makroskopowy uszkodzeń nie wykazuje znamienych różnic w porównaniu do kontroli to jednak obraz histologiczny istotnie różni się w porównaniu do kontroli. W grupach tych obserwuje się dalsze pogorszenie obrazu histologicznego w porównaniu do kontroli dla tej grupy, co koreluje z znamienne niższym przepływem krwi będącym następstwem nie tylko ograniczenia przepływu, ale także sensorycznego odnerwienia języka. Obserwacje powyższe rzucają nowe światło na zespoły przewlekłych owrzodzeń błon śluzowych. Schorzenia takie obserwowane głównie u ludzi cierpiących na cukrzycę, chorych w przebiegu immunosupresji oraz niektóre choroby nowotworowe (129, 209). Przedstawiony model doświadczalny pokazuje, że gojenie owrzodzeń zależy nie tylko od lokalnych zmian ukrwienia na poziomie mikrokrażenia w przebiegu zmian charakterystycznych dla mikroangiopatii cukrzycowej, ale także wykazuje silną zależność od całkowitego przepływu krwi w obrębie łożyska naczyniowego. Spostrzeżenia te wydają się być istotne, ponieważ u osób prezentujących zmiany w przebiegu wyżej wymienionych schorzeń upośledzenie przepływu na poziomie mikrokrażenia niejednokrotnie koreluje ze zmianami w obrębie dużych naczyń, w tym dystrybucyjnych tętnic mięśniowych szyi. Ponadto w chorobach tych niezwykle istotną rolę odgrywa niewydolność unerwienia czuciowego, które w przebiegu słabiej unaczynionych warstw błony podśluzowej ulega uszkodzeniu jako pierwsze dając wyraz mikroneuropatii przechodzącej w polineuropatie, która nie tylko stanowi, jak

dotychczas sądzono problem regulacji wydzielania i motoryki przewodu pokarmowego, ale także w istotny sposób może modyfikować (jak pokazały niniejsze doświadczenia) odnowę błon śluzowych, w tym błony śluzowej jamy ustnej.

Przeprowadzona analiza farmakologiczna dowiodła, że unerwienie czuciowe pełni zasadniczą rolę w procesach odnowy błony śluzowej jamy ustnej, przy czym wyniki doświadczeń wskazują, że zdolność unerwienia czuciowego do zwiększania ukrwienia tkanki na poziomie mikrokrażenia jest czynnikiem w głównej mierze odpowiedzialnym za obserwowane przyspieszenie procesu gojenia. Mechanizm tych oddziaływań w obrębie tkanej jamy ustnej pozostaje słabo poznany. Badania nad mechanizmem naczyniorozszerzającego oddziaływania włókien sensorycznych w różnych łożyskach naczyniowych dowodzą, że pośród neuropeptydów uwalnianych z zakończeń aktywowanych cienkich włókien czuciowych zasadnicze znaczenie odgrywa CGRP. Peptyd ten oddziałuje za pośrednictwem swoistego receptora CGRP₁ i prowadzi do zmniejszenia aktywności skurczowej mięśni gładkich ścian naczyń krwionośnych, czego następstwem jest rozszerzenie naczyń i wzrost przepływu krwi (53, 96, 134, 161, 192). Mechanizm ten ma znaczenie przede wszystkim w obrębie naczyń oporowych jednostek mikrokrażenia i prowadzi do zwiększenia lokalnego przepływu krwi w okolicy unerwianej przez pobudzone włókna czuciowe. Zmiany przepuszczalności jonowej błon komórkowych komórek mięśni gładkich ścian naczyń krwionośnych i ich następowa hiperpolaryzacja są odpowiedzialne za efekty oddziaływania CGRP, który to mechanizm został odkryty w toku badań neurofizjologicznych tkanek zaopatrywanych przez włókna czuciowe. Szczegółowe badania mechanizmu oddziaływania CGRP na układ naczyniowy w obrębie jamy ustnej dowodzą, że w naczyniorozszerzającym oddziaływaniu CGRP przeważa mechanizm pośredniego oddziaływania oparty na stymulacji śródbłonna, czego następstwem jest wzmożona synteza i uwalnianie czynników naczyniorozszerzających (jak tlenek azotu). Ich działanie o charakterze parakrynnym prowadzi do rozszerzenia naczyń prekapilarnych, w tym zwieraczy prekapilarnych, a tym samym zwiększenia przepływu mikrokrażeniowego w obrębie ściany jamy ustnej oraz języka. Efekt takiej stymulacji jest długotrwały - dłuższy w porównaniu z efektami obserwowanymi jako następstwo bezpośredniego oddziaływania na komórki mięśni gładkich ścian naczyń, co zwiększa podaż tlenu i substancji odżywczych długo po aktywacji unerwienia czuciowego (25, 37 54, 61, 124, 192, 193, 198). Efekt odległy w postaci objawów reakcji zapalnej jak zwiększenie przepuszczalności naczyniowej zależy w pierwszej kolejności od obecności substancji

wazoaktywnych wydzielanych w odpowiedzi na oddziaływanie neuropeptydów. Badania nad fizjologią unerwienia czuciowego pokazują, że obok CGRP innym neuropeptydem promującym wzrost przepływu w łożyskach mikrokrążenia jest Substancja P (SP), której efekty naczyniowe zależne są od aktywacji szybko metabolizowanych przekaźników natury humoralnej takich jak histamina. Z uwagi na sposób oddziaływania SP, jego efekty naczyniowe są krótkotrwałe i w znacznej mierze polegają na zwiększaniu przepuszczalności ścian naczyń krwionośnych, co pozwala na zwiększoną wymianę pomiędzy osoczem i przestrzenią zewnątrzkomórkową, a w stanach przewlekłego zapalenia neurogenne jest odpowiedzialne za komponentę obrzękową zapalenia (41, 66, 111, 131, 158). W świetle badań neurofizjologicznych wydaje się, że w warunkach *In vivo* pozostałe neuropeptydy uwalniane z zakończeń włókien czuciowych w pobliżu naczyń krwionośnych warstwy podśluzowej odgrywają marginalne znaczenie w kontroli szerokości naczyń krwionośnych (124, 131, 192). Dlatego też w niniejszej pracy, w której analizowano znaczenie unerwienia czuciowego w procesie gojenia obejmującym pełne przekształcenie tkanki ziarninowej (okres czterech dób) skupiono się na badaniu znaczenia CGRP jako peptydu o najlepiej udokumentowanym udziale w procesach gojenia tkanek przewodu pokarmowego. Stosowano egzogennie podawany CGRP oraz swoisty bloker receptorów CGRP₁ – fragment 8 – 37 łańcucha aminokwasowego peptydu (134). Zastosowanie egzogenne CGRP prowadziło do znamiennego morfologicznie przyspieszenia procesu gojenia owrzodzeń zarówno w obrębie błony śluzowej języka jak i policzka, czemu towarzyszyła istotna poprawa obrazu histologicznego tkanek w obszarze uszkodzeń w porównaniu do kontroli dla powyższych grup. Obserwacje te są zbieżne ze spostrzeżeniami autorów wskazujących na znaczenie CGRP w procesie gojenia owrzodzeń błony śluzowej żołądka oraz jelit (85, 79, 115, 154, 161). W pracach wykonywanych na materiale zwierzęcym badacze podkreślają istotny wzrost tkankowego przepływu krwi obserwowany po zastosowaniu CGRP. Obserwacje takie dotyczyły zarówno błony śluzowej przewodu pokarmowego (szczególnie często opisywane w obrębie żołądka) jak i narządów miękkich, w tym wątroby i trzustki (34). Podobne zjawiska krążeniowe obserwowano w obrębie tkanek jamy ustnej policzka i języka, tak w obrębie tkanki prawidłowej, jak i w brzegu indukowanych chemicznie owrzodzeń.

Dla możliwie najpełniejszej analizy znaczenia CGRP jako mediatora włókien neuronów układu sensorycznego w jamie ustnej porównywano wartości

mikrokrążeniowego przepływu krwi oraz obrazu morfologiczne i histologiczne owrzodzeń w obrębie języka i policzka w grupach zwierząt pozbawionych unerwienia czuciowego, w których nie podano oraz podawano CGRP. W grupach pozbawionych unerwienia sensorycznego gojenie owrzodzeń i przepływ mikrokrążeniowy w ich brzegu jest znamienne upośledzony, jednak podawanie CGRP w tych grupach istotnie przyspieszało gojenie owrzodzeń zarówno na powierzchni języka jak i policzka, czemu towarzyszył wzrost przepływu mikrokrążeniowego w obrębie brzegu owrzodzeń rejestrowany w różnych okresach gojenia. Wyniki tych doświadczeń dowiodły, że podobnie jak w innych odcinkach układu pokarmowego CGRP jest zasadniczym czynnikiem spośród mediatorów neuropeptydowych uwalnianych z zakończeń włókien czuciowych zwiększającym żywotność tkanek i stymulującym proces odnowy. Prawdopodobnie działanie to związane jest ze znacznym (w porównaniu do innych mediatorów neuropeptydowych) potencjałem angiogennym CGRP oraz jego zdolnością do zwiększania ukrwienia tkanek w okolicy zaopatrywanej przez włókna czuciowe. Badania immunohistologiczne pokazują ponadto, że włókna czuciowe zlokalizowane w obrębie policzka oraz języka wykazują znaczną immunoreaktywność względem CGRP, co odpowiada dużej gęstości peptydu w tych zakończeniach (45, 58, 73, 111, 152). Protekcyjne działanie CGRP może więc być związane nie tylko z jego swoistym i nieswoistym działaniem troficznym, ale także z większą (w porównaniu do pozostałych mediatorów neuropeptydowych) jego ilością w obrębie zakończeń włókien czuciowych jamy ustnej.

Z uwagi na stwierdzone istotne znaczenie CGRP w mediacji efektów naczyniowych układu sensorycznego oraz jego udziału w procesach gojenia tkanek jamy ustnej postanowiono dokonać pełniejszej analizy znaczenia tego peptydu włączając w to analizę receptorową. W celu analizy mechanizmu receptorowego oddziaływania CGRP stosowano bloker receptora CGRP₁ - CGRP₈₋₃₇ fragment. Podanie tej substancji kompetycyjnie blokującej miejsca aktywne w obrębie receptorów CGRP spowodowało istotne pogorszenie obrazu makroskopowego oraz histologicznego tkanek, jak również wywołało znaczącą redukcję wielkości przepływu mikrokrążeniowego w brzegu owrzodzenia zarówno w ostrej fazie indukcji zapalenia jak i w 7 dniu gojenia owrzodzeń. Ponadto zastosowanie CGRP po podaniu blokera receptora CGRP₁ nie powodowało istotnego zwiększenia wartości przepływu w wyżej wspomnianych okresach oraz nie zmieniało obrazu stopnia uszkodzenia tkanek w porównaniu do grupy zwierząt, w której podano wyłącznie bloker. Eksperymenty te

dowodzą istotnego znaczenia receptora CGRP₁ w mediacji efektów naczyniowych oraz biologicznych CGRP w tkance policzka i języka. Doświadczenia niniejsze pokazały, że znaczenie pozostałych układów receptorowych dla CGRP w zjawisku protekcji jest marginalne, podobnie jak w obrębie innych narządów przewodu pokarmowego, gdzie znaczenie receptora CGRP₂ obecnego na niektórych komórkach serii APUD oraz niewielkiej populacji komórek układu immunologicznego oraz śródbłonna jest znikoma (28, 30, 35, 45, 74, 84, 197). Sytuacja taka wynika najpewniej nie tylko ze znacznie mniejszej liczby receptorów, ale także jest następstwem nieobecności receptora CGRP₂ w lokalizacji bezpośrednio na komórkach mięśniówki gładkiej ścian naczyń, co może tłumaczyć, dlaczego ich znaczenie w kontroli szerokości naczyń krwionośnych, jak również wpływ na procesy odnowy jest niewielki.

Interesujących obserwacji dostarczyło porównanie procesu gojenia tkanki języka i policzka w obrębie poszczególnych grup doświadczalnych, w których analizowano znaczenie układu sensorycznego i jego mediatorów. Obserwowane znamienne mniejsze różnice stopnia uszkodzenia tkanki w obrazie histologicznym oraz morfologicznym w obrębie tkanki języka w porównaniu do tkanek policzka w 7 dniu ich gojenia wskazują na większą reaktywność tkanki języka poddanej oddziaływaniu mediatorów peptyderygicznych i aktywacji ich receptorów. W tkance języka obserwowano znamienne większe zmiany przepływu mikrokrazeniowego oraz istotne różnice szybkości regeneracji tkanki w obrębie owrzodzeń po modyfikacji, jakim poddawano układ sensoryczny. Wydaje się, że zjawisko w pierwszej kolejności związane jest z uwarunkowaniami natury anatomicznej. W obrębie tkanki policzka obecne są liczne dodatkowe komponenty unerwienia naczyniorozszerzającego nie funkcjonujące w tkance języka – głównie unerwienie parasympatyczne uwalniające na swoich zakończeniach acetylocholinę oraz wazoaktywny peptyd jelitowy, które w tej lokalizacji wykazują duży potencjał oddziaływania naczyniorozszerzającego na tkanki (71, 120, 160, 143, 211). Wydaje się, że to bogate unerwienie obejmujące także zewnętrzne powierzchnie dziąseł poznane z uwagi na znaczenie, jakie przypisuje się mu ze względu na przebieg chorób przyzębia odgrywa niezwykle istotną rolę w modulacji procesu gojenia błon śluzowych. Pomimo, że w warunkach patologii związanych z kolonizacją bakteryjną, silne obrzęki wazoaktywne będące następstwem indukcji przewlekłego zapalenia neurogennego mogą prowadzić do niszczenia aparatu więzadłowego zęba i nawet jego utraty (co sprawia, że mechanizmy te są rozpoznawane przez niektórych autorów jako cel walki z chorobami przyzębia), o tyle ograniczona

lokalna stymulacja układu sensorycznego w modelach doświadczalnych znamienne zwiększa potencjał odnowy tkanek (10, 106, 204). Wydaje się, że zwiększone unerwienie naczyń rozszerzające tkanki policzka sprawia, że jest ona mniej podatna na stres związany z selektywnym odnerwieniem w zakresie układu sensorycznego, co może tłumaczyć istotnie mniejsze różnice w odpowiedzi układu naczyniowego na zniszczenie tego układu czy blokowanie układów receptorowych dla CGRP.

Interesujących wniosków dostarczyło porównanie analizy znaczenia CGRP oraz jego receptora w grupach z zachowanym prawidłowym przepływem krwi oraz przepływem ograniczonym przez częściową okluzję tętnic szyjnych. W grupach, w których zredukowano przepływ krwi przez zastosowanie chronicznej częściowej jednostronnej okluzji tętnic szyjnych obserwowano znamienne różnice w przebiegu procesu odnowy tkanek po podaniu egzogennej CGRP (w porównaniu do grup o zachowanym prawidłowym przepływie krwi) wyrażone zmniejszeniem powierzchni uszkodzeń po zastosowaniu CGRP oraz ich istotnym zwiększeniem po zastosowaniu blokera receptora CGRP₁ (efekty te były porównywalne z obserwowanymi w grupie, w której dokonano odnerwienia sensorycznego). U zwierząt, u których ograniczono przepływ tkankowy obserwowane różnice wartości przepływu mikrokrażeńiowego w brzegu owrzodzenia oraz zmiany dynamiki procesu gojenia oceniane makroskopowo oraz histologicznie po zastosowaniu CGRP oraz jego blokera a także w grupie, w której zwierzęta poddano selektywnemu odnerwieniu w zakresie układu sensorycznego w tkance były podobne jak w przypadku zwierząt z zachowanym prawidłowym przepływem krwi. W grupach tych, chociaż obserwowano znamiennej redukcję dynamiki procesu regeneracji tkanki języka analiza statystyczna procesu gojenia wykazała, że oddziaływanie mediatorów układu sensorycznego było podobne, jak u zwierząt z prawidłowym przepływem, gdzie w porównaniu do kontroli dla grup o zredukowanym przepływie krwi obserwowano znamiennej poprawę obrazu histologicznego, co korelowało ze zwiększeniem przepływu w obrębie tkanek. Natomiast w obrębie tkanek policzka u zwierząt z indukowanym częściowym niedokrwieniem tkanek po podaniu CGRP obserwowano brak istotnego przyspieszenia procesu gojenia w obrazie makroskopowym bez towarzyszącej poprawy obrazu histologicznego.

W przypadku tkanki policzka podawanie CGRP nie wywoływało poprawy obrazu histologicznego oraz nie przyspieszało znamiennej procesu gojenia owrzodzeń. Wydaje się, że częściowa okluzja tętnic szyjnych wywołała tak znaczące obniżenie

natlenowania tkanek i podaży substancji odżywczych, że odnowa tkanki była niemożliwa, co uwidoczniło na preparatach histologicznych oraz podczas badań makroskopowych. Blokowanie receptorów CGRP₁ podobnie jak odnerwienie sensoryczne w obrębie tkanek policzka nie wywołało znamienych różnic w porównaniu do kontroli zarówno w zakresie obrazów makroskopowych (w grupach tych nie obserwowano gojenia zmian), jak i w obrazie histologicznym (w których widoczny był brak cech gojenia). W przypadku tkanki policzka obserwowano tak znaczne ograniczenie procesu gojenia w następstwie redukcji przepływu tkankowego, że modyfikacje układu sensorycznego pozostawały bez wpływu zarówno na obraz histologiczny jak i makroskopowy owrzodzeń. Natomiast tkanka języka zachowała reaktywność na mediatory układu sensorycznego, ponieważ podawanie egzogenego CGRP prowadziło do zwiększania wartości przepływu mikrokązeniowego oraz przyspieszało proces gojenia. Podawanie blokera receptorów CGRP₁ czy chemiczna ablacja układu sensorycznego wywoływała znamienne pogorszenie obrazu histologicznego tkanek, czemu towarzyszyło zwiększenie powierzchni uszkodzeń. W grupach tych obserwowano ponadto znamienne różnice wartości przepływu tkankowego w obrębie języka w grupach zwierząt z zachowanym oraz zniszczonym unerwieniem czuciowym.

Wydaje się, że różnice w obrazie histologicznym w obrębie tkanek języka oraz policzka obserwowane pomiędzy grupami, w których modyfikowano czynność układu sensorycznego po częściowym ograniczeniu przepływu tkankowego są w pierwszej kolejności wynikiem znacznie lepszego ukrwienia tkanek języka w porównaniu do policzka. Warunki anatomiczne sprawiają, że zaopatrzenie języka w krew może być obustronne, co nabiera dużego znaczenia w przypadku jednostronnej częściowej okluzji (121, 212). Tkanka policzka pozbawiona jest możliwości kompensacji jednoimiennego, jednostronnego obniżenia ciśnienia perfuzyjnego, co sprawia, że w przypadku takiego ograniczenia przepływu gojenie jest znacznie wolniejsze a odpowiedź na czynniki farmakologiczne słabsza czy nawet zniesiona. Dotychczas brak jest analiz klinicznych zróżnicowania częstości występowania chorób troficznych w obrębie zewnętrznej powierzchni dziąseł i policzka oraz języka. Wyniki niniejszej pracy wskazujące na istotne zróżnicowanie procesu gojenia owrzodzeń jamy ustnej w zależności od ich lokalizacji w jamie ustnej sugerują potrzebę przeprowadzenia takich badań.

Analiza mikrokązeniowego przepływu krwi po podaniu CGRP wykazała znamienne zwiększenie przepływu zarówno w obrębie tkanek policzka jak i języka, z

czym prawdopodobnie związane było istotne zwiększenie szybkości gojenia zmian. W grupach tych szczególnie znaczące wzmożenie przepływu obserwowano w brzegu owrzodzenia po 7 dniach gojenia, co odzwierciedla przebieg fizjologicznych procesów naprawczych i odpowiada okresowi, w którym dochodziło do ukształtowania struktury naczyń mikrokrążenia jako następstwa neowaskularyzacji uformowanego zrębu tkankowego. Za obserwowany efekt odpowiedzialna jest najpewniej zwiększona reaktywność nowych naczyń oraz efekt utrzymującej się stymulacji przez czynniki wzrostu o działaniu synergistycznym z CGRP i znamienne zwiększających efekt jego działania. Efekt istotnego wzrostu przepływu w tkance brzegu owrzodzenia obserwowany w krótkim okresie po indukcji uszkodzeń był najpewniej związany ze znamienym zwiększeniem przepływu w obrębie zdrowej tkanki przyległej, co stanowi istotny mechanizm promujący gojenie, ponieważ pozwala na znacznie szybsze formowanie ziarniny i wzrost naczyń w obręb nowopowstałej tkanki. Znaczna korelacja wielkości przepływu mikrokrążeniowego z obrazem morfologicznym i histologicznym tkanek wskazuje na dominujące znaczenie ukrwienia tkanki dla procesu jej regeneracji. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy pokazały dominujące znaczenie unerwienia czuciowego w protekcji błony śluzowej jamy ustnej, które wykazuje zdolności ochronne w pierwszej kolejności za pośrednictwem zwiększonego przepływu krwi w obrębie tkanek aktywowanych przez bodźce uszkodzające. Wiadomo jednak, że przewlekła aktywność układu sensorycznego, który indukuje proces zapalenia neurogennego wykazuje wpływ niszczący na tkanki. Wydaje się więc, że umiejętność farmakologicznej kontroli aktywności układu sensorycznego pozwoliłaby nie tylko stymulować proces gojenia owrzodzeń ale także otworzyłaby drogę dla ochrony przed chorobami zapalnymi jamy ustnej. Wiedza o tych procesach otwiera szerokie możliwości opracowania nowych strategii leczenia tych powszechnych schorzeń jamy ustnej.

WNIOSKI

1. Unerwienie sensoryczne błony śluzowej jamy ustnej odgrywa istotną rolę w kontroli śluzówkowego przepływu krwi. Neurony te wykazują toniczny wpływ naczyniorozszerzający, którego wyeliminowanie prowadzi do redukcji przepływu krwi przez błonę śluzową.
2. W mechanizmie sensorycznie indukowanych naczyniorozkurczowych efektów mikrokrażeńiowych pośredniczy jako główny neuroprzekaźnik CGRP będący agonistą receptora $CGRP_1$ umiejscowionego w efektorach ścian naczyń błony śluzowej jamy ustnej.
3. W niniejszych badaniach dowiedziono również, że sensoryczne naczynioruchowe unerwienie błony jamy ustnej w istotny sposób utrzymuje homeostazę mikrokrażenia tego łożyska w stanie ischemii indukowanej zmniejszeniem dopływu krwi do tego łożyska z głównych zaopatrujących go tętnic.
4. Przeprowadzone badania dowiodły, że neurosensorycznie kontrolowane mikrokrażeńiowe zmiany śluzówkowego przepływu krwi odgrywają dominującą rolę w dynamice procesu gojenia doświadczalnych uszkodzeń błony śluzowej jamy ustnej ocenionych morfologicznie. Te adaptacyjne reakcje mikrokrażenia błony śluzowej przyspieszają gojenie jej uszkodzeń poprzez wzrost lokalnego ukrwienia tkanki. Ponadto dokonana farmakologiczna analiza dowiodła, że zniszczenie neuronów czuciowych potęguje uszkodzenie błony śluzowej i zwalnia proces jej gojenia poprzez upośledzenie mikrokrażenia.
5. Istotnym spostrzeżeniem dokonany w tych badaniach jest wykazanie, że lokalne naczyniowo-ruchowe mikrokrażeńiowe reakcje indukowane przez neurony czuciowe w błonie śluzowej policzka są znamienne słabsze niż te obserwowane w błonie śluzowej języka. Fenomen ten może być tłumaczony większą gęstością zakończeń sensorycznych w błonie śluzowej języka.

7. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Jama ustna, która stanowi pierwszy odcinek przewodu pokarmowego w dużym stopniu narażony na uszkodzenia, wykazuje bardzo bogate unerwienie czuciowe, w większej części reprezentowane przez cienkie włókna niezmielinizowane. Mediatory uwalniane z zakończeń aktywowanych włókien czuciowych wykazują działanie ochronne błon śluzowych przewodu pokarmowego. Znaczenie unerwienia czuciowego w protekcji i procesach gojenia błony śluzowej jamy ustnej pozostaje słabo poznane.

Celem niniejszych badań było określenie znaczenia włókien czuciowych i mediatorów uwalnianych z ich zakończeń w procesie gojenia eksperymentalnych owrzodzeń jamy ustnej oraz poznanie mechanizmów leżących u podłoża tych zjawisk.

Badanie przeprowadzono na szczurach rasy Wistar obu płci. Zwierzęta podzielono na 10 grup, z których każda liczyła po 8 zwierząt. U zwierząt wywoływano chemiczne owrzodzenia na powierzchni błony śluzowej języka i policzka przez aplikację 70% kwasu octowego przez 30 sekund podanego w sztancy o średnicy 4 mm. Kontrolę stanowiły zwierzęta nie otrzymujące preparatów farmakologicznych, u których indukowano owrzodzenia błony śluzowej jamy ustnej (na powierzchni policzka i języka). U zwierząt tych oceniano wyniki gojenia po 7 dniach od indukcji uszkodzeń: grupę 1 stanowiły zwierzęta o prawidłowym przepływie krwi, w grupie 2 ograniczano przepływ tkankowy przez częściową okluzję tętnic szyjnych. Grupy 3 – 7 z zachowanym prawidłowym przepływem krwi otrzymywały: grupa 3 - CGRP - 50 mg/kg i.p., grupa 4 - CGRP₈₋₃₇ – 50 mg/kg i.p., grupa 5 - CGRP - 50 mg/kg i.p. oraz CGRP₈₋₃₇ – 50 mg/kg i.p., grupa 6 – kapsaicyna 0,1% s.c. Grupa 7 - kapsaicyna 0,1% s.c. + CGRP 50 mg/kg i.p. Grupy 8-10 z ograniczonym przepływem tkankowym otrzymywały: grupa 8 - CGRP 50 mg/kg i.p., Grupa 9 - CGRP₈₋₃₇ – 50 mg/kg i.p., Grupa 10 – kapsaicyna 0,1% s.c. Badano wartość przepływu mikrokrażeńowego w brzegu owrzodzenia 120 min. po indukcji uszkodzeń oraz w 7 dniu gojenia. Następnie powierzchnie uszkodzeń oceniano planimetrycznie oraz pobierano tkanki do oceny histologicznej uszkodzeń (po obróbce zostały przygotowane w formie preparatów barwionych). Wyniki zostały opracowane statystycznie przy użyciu programu statistica 5.1 Uzyskano następujące wyniki: chemiczna ablacja włókien czuciowych czy blokowanie receptora CGRP₁, jak również blokowanie receptora CGRP₁ z następowym podawaniem CGRP prowadziły do znamiennego wzrostu powierzchni uszkodzeń

ocenianych planimetrycznie a w obrazie histologicznym pogorszenia w skali własnej. Zjawisku temu towarzyszyła istotna redukcja przepływu mikrokrazeniowego (LDBF) w porównaniu do kontroli zarówno w początkowym jak i końcowym okresie gojenia. Podanie CGRP prowadziło do istotnej poprawy obrazu histologicznego oraz przyspieszenia gojenia tkanek z towarzyszącym LDBF w brzegu owrzodzeń. Ograniczenie przepływu mikrokrazeniowego prowadziło do znamiennej redukcji szybkości gojenia owrzodzeń zarówno na policzku jak i języku, w obrębie błony śluzowej języka podanie CGRP wywołało częściową poprawę histologicznego obrazu owrzodzeń, błona śluzowa policzka pozostawała nie zagojona.

Wyniki niniejsze pozwalają stwierdzić, że włókna czuciowe obecne w jamie ustnej a zwłaszcza CGRP uwalniane z zakończeń neuronów tego układu zwiększają znamienne zdolność regeneracji błony śluzowej różnych obszarów jamy ustnej. Za zjawisko to odpowiedzialna jest zdolność mediatorów układu sensorycznego a w pierwszej kolejności CGRP do zwiększania przepływu tkankowego, którego wzrost w brzegu owrzodzenia istotnie wzmacnia proces ich gojenia.

8. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

The oral cavity as the first contact area with food is exposed to injury from various noxious factors. It is known that walls of the oral cavity are densely innervated, especially by thin unmyelinated sensory fibers. Mediators released from the endings of activated sensory neurons increase resistance of the mucosa of the digestive tract and promote healing of the injuries. However, the importance of sensory innervation in protection and healing of the oral mucosa is still not recognized in sufficient degree.

The aim of the present study was to establish the importance of sensory fibers and mediators released from their endings in the healing of the experimentally induced chemical ulcerations of the oral cavity and to evaluate mechanism which underlies their action.

The experiments were carried out with Wistar rats of both sexes. The animals were divided to 10 experimental groups, with 8 animals in each. The surface chemical ulcerations to the buccal and tongue mucosa were evoked by 70% acetic administered in a 4 mm diameter plastic mold for 30 second. The control group consisted of animals with induced ulceration of the oral mucosa (at the surface of bucca and tongue) and no pharmacological substances administered (group 1 and 2). The ulcer healing effects were examined after 7 days from the induction. Group 1 consisted of animals with normal carotid blood flow; in the group 2, carotid blood flow was limited by a partial carotid occlusion. Groups 3-7 with the maintained normal carotid blood flow were preadministered as follows: group 3 – CGRP: 50 mg/kg i.p., group 4 - CGRP₈₋₃₇: 50 mg/kg i.p., group 5 – CGRP: 50 mg/kg i.p. and CGRP₈₋₃₇ – 50 mg/kg i.p., group 6 – kapsaicin 0,1% s.c. Group 7 - kapsaicin 0,1% s.c. + CGRP: 50 mg/kg i.p. Groups 8-10, with the limited carotid blood flow were preadministered as follows: group 8 with CGRP: 50 mg/kg i.p.; group 9 - CGRP₈₋₃₇ : 50 mg/kg i.p.; and group 10 – kapsaicin 0,1% s.c. The value of the microcirculatory blood flow was measured in the ulcer margin 120 minutes after induction of acetic ulcers and on the 7th day of healing. The area of ulcerations was then examined planimetrically and the ulcerated tissues were collected for histological processing (in the form of stained preparations) and for examinations.

The recorded data were statistically analyzed using Statistica 5.1 PC based program. The following results were obtained: chemical ablation of the sensory fibers or blockade of CGRP1 receptors, also followed by CGRP administration markedly increased the area of the planimetrically examined ulcerations and caused worsening of their histological picture (according to the author's own scale). This was accompanied by a significant reduction of microcirculatory blood flow (LDBF) in comparison to the control groups, both in the initial and final healing periods. CGRP administration markedly improved the histological picture and accelerated healing of the tissues with concomitant LDBF in the ulcer margin. The reduction of microcirculatory blood flow markedly decelerated healing of buccal and tongue mucosa ulceration. Administration of CGRP induced a partial improvement in the histological picture of the ulcerations in the area of tongue mucosa, whereas the buccal mucosa ulcerations remained unhealed.

The obtained results indicate that sensory neurons, present in the walls of the oral cavity, and particularly CGRP released from endings of neurons markedly increase the regeneration of various parts of the oral mucosa. This is primarily associated with the ability of peptydergic mediators of sensory system, especially CGRP, to increase tissue blood flow in the ulcer margin which is an important factor sustaining their healing process.

9. LITERATURA

1. [Akerman S](#), [Kaube H](#), [Goadsby PJ](#). Vanilloid type 1 receptors (VR1) on trigeminal sensory nerve fibres play a minor role in neurogenic dural vasodilatation, and are involved in capsaicin-induced dural dilation. *Br J Pharmacol* 2003 Oct; 140 (4): 718 - 24.
2. Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM. Alternative RNA processing in calcitonin gene-expression mRNA encoding different polypeptide products. *Nature* 1982; 298: 240 - 244.
3. Avery JK, Cox CF, Chiego DJ. Presence and location of adrenergic nerve endings in the dental pulps of mouse molars. *Anat. Rec.* 1980; 198: 59 - 71.
4. Awawdeh LA, Lundy FT, Linden GJ, Shaw C, Kennedy JG, Lamey PJ. Quantitative analysis of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in gingival crevicular fluid associated with painful human teeth. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110: 185-191.
5. [Baluk P](#), [Bertrand C](#), [Geppetti P](#), [McDonald DM](#), [Nadel JA](#). NK1 receptors mediate leukocyte adhesion in neurogenic inflammation in the rat trachea. *Am J Physiol.* 1995 Feb; 268 (2 Pt 1): 263 - 269.
6. Bartkowski SB. *Chirurgia szczękowo-twarzowa*. Wydawnictwo UJ, Kraków 1996.
7. Bayliss. W.M. On the origin from the spinal cord of the vasodilator fibres of the hind limb and on the nature of these fibres. *J Physiol.* 1901; 26, 173 - 209.
8. Berggreen E, Heyeraas KJ. Effect of the sensory neuropeptide antagonists h-CGRP (8-37) and SR 140.33 on pulpal and gingival blood flow in ferrets. *Arch Oral Biol.* 2000; 45: 537 - 542.
9. Berggreen E, Heyeraas KJ. The role of sensory neuropeptides and nitric oxide on pulpal blood flow and tissue pressure in the ferret. *J Dent Res.* 1999; 78 (9): 1535 - 1543.
10. Berggreen E, Sae-Lim V, Bletsa A, Heyeraas KJ. Effect of denervation on

- healing after tooth replantation in the ferret. *Acta Odontol Scand.* 2001; 385: 379 - 385.
11. [Berthoud HR](#), [Neuhuber WL](#). Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton Neurosci.* 2000 Dec 20; 85 (1-3): 1 - 17.
 12. Bongenhielm U, Boissonade FM, Wesermark A, Robinson PP, Fried K. Sympathetic nerve sprouting fails to occur in the trigeminal ganglion after peripheral nerve injury in the rat. *Pain* 1999; 82: 183 - 288.
 13. Bongenhielm U, Haegerstrand A., Theodorsson E, Freid K. Effect of neuropeptides on growth of cultivated rat molar pulp fibroblasts. *Regul Pept.* 1995; 60: 91 - 98.
 14. Bouvier M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2: 274 - 286.
 15. [Bowles WR](#), [Flores CM](#), [Jackson DL](#), [Hargreaves KM](#). β_2 -Adrenoceptor regulation of CGRP release from capsaicin-sensitive neurons. *J Dent Res.* 2003 Apr; 82 (4): 308 - 311.
 16. Brack A, Rittner HL, Stein C. Neurogenic painful inflammation. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2004; 17: 461 - 464.
 17. Brain SD. Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. *Immunopharmacology.* 1997; 37: 133 - 152.
 18. Brain SD., Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature* 1985; 313, 54 - 56.
 19. [Brzozowski T](#), [Konturek PC](#), [Konturek SJ](#), [Pajdo R](#), [Schuppan D](#), [Drozdowicz D](#), [Ptak A](#), [Pawlik M](#), [Nakamura T](#), [Hahn EG](#). Involvement of cyclooxygenase (COX)-2 products in acceleration of ulcer healing by gastrin and hepatocyte growth factor. *J Physiol Pharmacol.* 2000 Dec; 51 (4 Pt 1): 751 - 773.
 20. [Brzozowski T](#), [Konturek PC](#), [Sliwowski Z](#), [Drozdowicz D](#), [Hahn EG](#), [Konturek SJ](#). Importance of nitric oxide and capsaicin-sensitive afferent nerves in healing of stress lesions induced by epidermal growth factor. *J Clin Gastroenterol.* 1997; 25 Suppl 1: 28 - 38.
 21. [Brzozowski T](#), [Konturek PC](#), [Sliwowski Z](#), [Drozdowicz D](#), [Kwiecien S](#), [Pawlik M](#), [Pajdo R](#), [Konturek SJ](#), [Pawlik WW](#), [Hahn EG](#). Neural aspects of ghrelin-induced gastroprotection against mucosal injury induced by noxious agents. *J Physiol Pharmacol.* 2006; 57 Suppl 6: 63 - 76.
 22. [Brzozowski T](#), [Konturek SJ](#), [Sliwowski Z](#), [Pytko-Polonczyk J](#), [Szlachcic A](#),

- [Drozdowicz D.](#) Role of capsaicin-sensitive sensory nerves in gastroprotection against acid-independent and acid-dependent ulcerogens. *Digestion*. 1996; 57 (6): 424 - 432.
23. Byers MR. Dental sensory receptors. *Int Rev Neurobiol*. 1984; 25: 39- 94.
24. [Caterina MJ](#), [Schumacher MA](#), [Tominaga M](#), [Rosen TA](#), [Levine JD](#), [Julius D](#). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997; 23, 389 (6653): 816 - 824.
25. Caviades-Bucheli J, Arenas N, Guiza O, Moncada NA, Moreno GC, Diaz E, Munoz HR. Calcitonin gene-related peptide receptor expression in healthy and inflamed human pulp tissue. *Int Endod J*.2005; 38: 712 - 717.
26. Caviades-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: 394 - 400.
27. Chai J, Jones MK, Tarnawski AS. Serum response factor in a critical requirement for VEGF signaling in endothelial cells and VEGF-induced angiogenesis. *FASEB J*. 2004 Aug; 18 (11): 1264 - 1266.
28. [Chiba T](#), [Yamaguchi A](#), [Yamatani T](#), [Nakamura A](#), [Morishita T](#), [Inui T](#), [Fukase M](#), [Noda T](#), [Fujita T](#). Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist human CGRP-(8-37). *Am J Physiol*. 1989; 256 (2 Pt 1): 331 - 335.
29. Chow JYC, Ma L, Cho Ch. The role of adhesion molecules in gastric ulcer healing. *World J Gastroenterol*. 1998; 4 (6); 467 - 468.
30. Costa M., Brookes S.J.H., Hennig G.W. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 2000; 47 (4): 15-19.
31. Couture R, Cuello AC. Studies on the trigeminal antidromic vasodilatation and plasma extravasation in the rat. *J Physiol*. 1984; 346: 273 - 285.
32. Daley TD, Armstrong JE. Oral manifestation of gastrointestinal diseases. *Can J Gastroenterol*. 2007; 21, 4: 241 - 244.
33. De Swert KO, Joos GF. Extending the understanding of sensory neuropeptides. *Eur J Pharmacol*.2006; 533: 171 - 181.
34. Dembiński A, Warzecha Z, Ceranowicz P, Jaworek J, Sendur R, Knafel A, Dembiński M, Bilski J, Pawlik WW, Tomaszewska R, Stachura J, Konturek SJ. Stimulation of sensory nerves and CGRP attenuate pancreatic damage in

- ischemia/reperfusion induced pancreatitis. *Med Sci Monit.* 2003; 9 (12): 418-425.
35. Donoso M V., Fournier A., St-Pierre S., Huidobro-Toro P. Pharmacological characterization of CGRP1 receptor subtype in the vascular system of the rat: studies with hCGRP fragments and analogs. *Peptides* 1990; 11: 885 - 889.
 36. Dussor GO, Helesic G, [Hargreaves KM](#), Flores CM. Cholinergic modulation of nociceptive responses in vivo and neuropeptide release in vitro at level of the primary sensory neuron. *Pain* 2004; 107: 22 - 32.
 37. Dussor GO, Leong AS, Gracia NB, Kilo S, Price TJ, [Hargreaves KM](#), Flores CM. Potentiation of evoked calcitonin gene-related peptide from oral mucosa: a potential basis for the pro-inflammatory effects of nicotine. *Eur J Neurosci.* 2003; 18, 9: 2515 - 2526.
 38. Epstein JB, Schubert MM. Oral mucositis in myelosuppressive cancer therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999; 88: 273 - 276.
 39. Ernst H, Konturek PC, Hahn EG, Stosiek HP, Brzozowski T, Konturek SJ. Effect of local injection with basic fibroblast growth factor (BFGF) and neutralizing antibody to BFGF on gastric ulcer healing, gastric secretion, angiogenesis and gastric blood flow. *J Physiol Pharmacol.* 2001, 52: 377 - 390.
 40. Euler US, Gaddum JH. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol.* 1931; 72: 74 – 87.
 41. [Fazekas A](#) Matheny JL, Roth GI, Richardson DR. Effect of nitric oxide inhibition on capsaicin-elicited vasodilatation in the rat oral circulation. *Res Exp Med (Berl)* 1994; 194 (6): 357 - 365.
 42. [Fazekas A](#), [Gyorfi A](#), Irmes F, [Rosivall L](#). Effect of substance P administration on vascular permeability in rat dental pulp and submandibular gland. *Proc Finn Dent Soc.* 1992; 88 Suppl: 481 - 486.
 43. [Fazekas A](#), [Gyorfi A](#), [Posch E](#), [Jakab G](#), [Bartfai Z](#), [Rosivall L](#). Effect of denervation on the neurogenic inflammation of the rat mandibular mucosa. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1991 Apr; 343 (4): 393 - 398.
 44. [Fazekas A](#), Vindish K, [Posch E](#), [Gyorfi A](#). Experimentally-induced neurogenic inflammation in the rat oral mucosa. *J Periodont Res.* 1990; 25: 276 - 282.
 45. Flores Ch.M., Leong A.S., Dussor G.O., Harding-Rose C., Hargreaves K.M., Kilo S. Capsaicin -evoked CGRP release from rat buccal mucosa: development of a model

- system for studying trigeminal mechanisms of neurogenic inflammation. *Eur J Neurosci.* 2001; 14, 7: 1113 - 1120.
46. Folkman J, Szabo S, Stovroff M, McNeil P, Li W, Shing Y. Duodenal ulcer. Discovery of a new mechanism and development of angiogenic therapy that accelerates healing. *Ann Surg.* 1991; 241: 414 - 425.
47. Franco-Cereceda A, Henke H, Lundberg JM, Petermann JB, Hokfelt T, Fisher JA. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in capsaicin sensitive substance P-immunoreactive sensory neurons in animals and man: distribution and release by capsaicin. *Peptides* 1987; 8 (2): 399 - 410.
48. Fristad I, Heyeraas KJ, Jonsson R, Kvinnsland IH. Effect of inferior alveolar nerve axotomy on immune cells and nerve fibres in young rat molars. *Arch Oral Biol.* 1995; 40, 11: 1053 - 1062.
49. Fristad I, Heyeraas KJ, Kvinnsland IH. Neuropeptide Y expression in the trigeminal ganglion and mandibular division of the trigeminal nerve after inferior alveolar nerve axotomy in young rats. *Exp Neurol.* 1996; 142: 276 - 286.
50. [Fristad I](#), [Vandevska-Radunovic V](#), [Fjeld K](#), [Wimalawansa SJ](#), [Hals Kvinnsland I](#). NK1, NK2, NK3 and CGRP1 receptors identified in rat oral soft tissues, and in bone and dental hard tissue cells. *Cell Tissue Res.* 2003 Mar; 311 (3): 383 - 91. Epub 2003 Feb 4.
51. Fristad I. Dental innervation: functions and plasticity after peripheral injury. *Acta Odontol Scand.* 1997; 55: 236 - 254.
52. Fujimori A., Saito A., Kimura S., Goto K. Release of calcitonin gene - related peptide (CGRP) from capsaicin - sensitive vasodilator nerves in the rat mesenteric artery. *Neurosci Lett.* 1990; 112: 173 - 178.
53. Fujimori A., Saito A., Kimura S., Watanabe T., Uchiyam Y., Kawasaki H., Goto K. Neurogenic vasodilation and release of calcitonin gene-related peptide (CGRP) from perivascular nerves in the rat mesenteric artery. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989, 165: 1391 - 1398.
54. Furness JB., Costa M. The adrenergic innervation of the gastrointestinal tract. *Ergeb Physiol.* 1974; 69: 2- 51. Review.
55. Gazelius B, Edwall B, Olgart L, Lundberg JM, Hokfelt T, Fischer JA. Vasodilatory effect and coexistence of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P in sensory nerves of cat dental pulp. *Acta Physiol Scand.* 1987;

130: 33 - 40.

56. Gładysz T, Stypułkowska J, Walocha J, Gryglewski A, Skrzat J. Anatomiczne aspekty dróg czucia bólu z narządów i tkanek jamy ustnej oraz najczęściej stosowane metody znieczulenia miejscowego w tym obszarze anatomicznym. *Por Stomatol.* 2003; 5: 5 - 12.
57. Gleissner C, Kempfski O, Peylo S, Glatzel JH, Willershausen B. Local gingival blood flow at healthy and inflamed sites measured by laser Doppler flowmetry. *J Periodontol.* 2006; 77: 1762 - 1771.
58. Goto T., Kido MA., Yamaza T, Tanaka T. Substance P and substance P receptors in bone and gingival tissues. *Med Elektron Microsc.* 2001; 34: 77 - 85.
59. Gottselig R, Messlinger K. Noxious chemical stimulation of rat facial mucosa increase intracranial blood flow through a trigemino parasympathetic reflex-an experimental model for vascular dysfunctions in cluster headache. *Cephalgia* 2004; 24, 3: 206 - 214.
60. Gunthorpe MJ, Benham CD, Davis JB. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trend Pharmacol Sci.* 2002; 23: 183 - 236.
61. [Gustaw P](#), [Pawlik WW](#), [Czarnobilski K](#), [Sendur R](#), [Konturek SJ](#). Nitric oxide is involved in the mediation of gastric blood flow and tissue oxygenation. *J Physiol Pharmacol.* 1994 Sep; 45 (3): 361 - 368
62. Gustaw P., Pawlik W.W., Jacobson E.D., Sendur R., Konturek S.J. Role of capsaicin - sensitive neurons in the control of intestinal blood flow and oxygen uptake. *J Physiol Pharmacol.* 1995; 46: 63 - 70.
63. [Gyorfi A](#), [Fazekas A](#), Feher E, Ender F, Rosivall L. Effects of streptozotocin induced diabetes on neurogenic inflammation of gingivomucosal tissue in rat. *J Periodontal Res.* 1996; 31: 249 - 255.
64. [Gyorfi A](#), [Fazekas A](#), Irmes A, Jakab G, Suto T, Rosivall L. Role of substance P (SP) in development of symptoms of neurogenic inflammation in the oral mucosa of the rat. *J Periodontal Res.* 1993; 28: 191 - 196.
65. [Gyorfi A](#), [Fazekas A](#), Irmes A, Rosivall L. Effect of substance P administration on vascular permeability in the rat oral mucosa and sublingual glands. *J Periodontal Res.* 1995; 30: 181 - 185.
66. [Gyorfi A](#), [Fazekas A](#), Posch E, Irmes F, Rosivall L. Role of histamine in the development of neurogenic inflammation of rat oral mucosa. *Agents Actions.* 1991; 32, 3/4: 229 - 236.

67. [Gyorfi A](#), [Fazekas A](#), [Rosivall L](#). Neurogenic inflammation and the oral mucosa. *J Clin Periodontol*. 1992 Nov; 19 (10): 731 - 736.
68. [Hargreaves KM](#), [Bowles WR](#), [Jackson DL](#). Intrinsic regulation of CGRP release by dental pulp sympathetic fibers. *J Dent Res*. 2003 May; 82 (5): 398 - 401.
69. [Hargreaves KM](#), Jackson DL, Bowles WR. Adrenergic regulation of capsaicin-sensitive neurons in dental pulp. *J Endod*. 2003; 29, 6: 397 - 399.
70. [Hartung HP](#), [Toyka KV](#). Substance P, the immune system and inflammation. *Int Rev Immunol*. 1989 Jun; 4 (3): 229 - 249.
71. Haug SR, Heyeraas KJ. Modulation of dental inflammation by the sympathetic nervous system. *J Dent Res*. 2006; 85 (6): 488 - 495.
72. Helliwell RJ, McLatchie LM, Clarke M, Winter J, Bewan S, McIntyre P. Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. *Neurosci Lett*. 1988; 250: 177 - 180.
73. Heyeraas KJ, Kvinnsland I, Byers MR, Jacobsen EB. Nerve fibres immunoreactive to protein gene product 9.5, calcitonin gene-related peptide, substance P and neuropeptide Y in the dental pulp, periodontal ligament and gingival in cats. *Acta Odontol Scand*. 1993; 51: 207 - 221.
74. Hilliges M, Hellman M, Ahlstrom U, Johansson O. Immunohistochemical studies of neurochemical markers in normal human buccal mucosa. *Histochemistry* 1994; 101: 235 - 244.
75. Hirose H, Takeuchi K, Okabe S. Effect of indomethacin on gastric mucosal blood flow around acetic acid-induced ulcers in rats. *Gastroenterology*. 1991; 100: 1259 -1265.
76. Hokfelt T., Pernow B., Wahren J. Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *J Intern Med*. 2001; 249, 1: 27 – 40.
77. [Holzer P](#), [Livingston EH](#), [Saria A](#), [Guth PH](#). Sensory neurons mediate protective vasodilatation in rat gastric mucosa. *Am J Physiol*. 1991 Mar; 260 (3 Pt 1): 363 - 70.
78. [Holzer P](#), [Maggi CA](#). Dissociation of dorsal root ganglion neurons into afferent and efferent-like neurons. *Neuroscience*. 1998 Sep; 86 (2): 389 - 398.
79. [Holzer P](#), [Michl T](#), [Danzer M](#), [Jocic M](#), [Schicho R](#), [Lippe IT](#). Surveillance of the gastrointestinal mucosa by sensory neurons. *J Physiol Pharmacol*. 2001 Dec; 52 (4 Pt 1): 505 - 521.

80. [Holzer P](#), [Pabst MA](#). Visceral Afferent Neurons: Role in Gastric Mucosal Protection. *News Physiol Sci*. 1999 Oct; 14: 201 - 206.
81. [Holzer P](#). Afferent signalling of gastric acid challenge. *Physiol Pharmacol*. 2003 Dec; 54 Suppl 4: 43 - 53.
82. [Holzer P](#). Capsaicin as a tool for studying neuron functions. In Costa M, Surrenti C, Gorini S, Maggi CA, Meli A (Eds), *Sensory nerves and neuropeptides in gastroenterology*. Plenum Press 1991, New York. Pp 3-16.
83. [Holzer P](#). Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev*. 1991 Jun; 43 (2): 143 - 201.
84. [Holzer P](#). Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience*. 1988 Mar; 24 (3): 739 - 768.
85. [Holzer P](#). Nerves and gastric mucosal protection. *Dig Dis Sci*. 1990 Aug; 35 (8): 1048 - 1051.
86. [Holzer P](#). Neural emergency system in the stomach. *Gastroenterology*. 1998 Apr; 114 (4): 823 - 839.
87. [Holzer P](#). Neural injury, repair, and adaptation in the GI tract. The elusive action of capsaicin on the vagus nerve. *Am J Physiol*. 1998 Jul; 275 (1 Pt 1): 8 - 13.
88. Hottenstein O.D., Pawlik W.W., Jacobson E.D. Capsaicin - sensitive nerves modulate reactive hyperemia in rat gut. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1992; 199 (3): 311 - 320.
89. Hou M, Uddman R, Tajti J, Kanje M, Edvinsson L. Capsaicin receptor immunoreactivity in the human trigeminal ganglion. *Neurosci Lett*. 2002; 330: 223 - 226.
90. Hughes SR, Brain SD. Nitric oxide-dependent release of vasodilator quantities of calcitonin gene-related peptide from capsaicin-sensitive nerves in rabbit skin. *Br J Pharmacol*. 1994; 111: 425 - 430.
91. Ichikawa H, Sugimoto T. Vanilloid receptor 1-like receptor-immunoreactive primary sensory neurons in the rat trigeminal nervous system. *Neuroscience*. 2000; 101, 3: 719 -725.
92. Izumi H, Karita K. Innervation of the cat lip by two groups of parasympathetic vasodilator fibres. *J Physiol Lond*. 1993; 465: 501 - 512.
93. Izumi H, Karita K. Vasodilator responses following intracranial stimulation of

- the trigeminal, facial and glossopharyngeal nerves in the cat gingival. *Brain Res.* 1991; 560: 71 - 75.
94. Jacobsen EB, Fristad I, Heyeraas KJ. Nerve fibres immunoreactive to calcitonin gene-related peptide, substance P, neuropeptide Y, and dopamine β -hydroxylase in innervated and denervated oral tissues in ferrets. *Acta Odontol Scand.* 1998; 56: 220 - 228.
 95. Jacobsen EB, Heyeraas KJ. Effect of capsaicin treatment or inferior alveolar nerve resection on dentine formation and calcitonin gene-related peptide and substance P-immunoreactive nerve fibres in rat molar pulp. *Arch Oral Biol.* 1996; 41, 12: 1121 - 1131.
 96. Jacobson E.D., Berguer R., Pawlik W.W., Hottenstein O.D. Mesenteric Purinergic and Peptidergic Vasodilators. *Physiology of the gastrointestinal tract. Third Edition*, edited by Leonard R. Johnson. Raven Press, New York © 1994.
 97. Jacobson ED Vascular mediation of gastric mucosal damage and cytoprotection. *Indian J Physiol Pharmacol.* 1990 Oct; 34 (4): 223 - 234.
 98. Jancso G, Kiraly E, Suck G, Joo F, Nagy A. Neurotoxic effect of capsaicin in mammals. *Acta Physiol Hung.* 1987; 69: 295 - 313.
 99. Jancso N, Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol.* 1967; 31: 138 - 151.
 100. Jancso N, Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J. The role of sensory nerve endings in neurogenic inflammation induced in human skin and in the eye and paw of the rat. *Br J Pharmacol Chemother.* 1968; 32: 32 - 41.
 101. Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J. Neurogenic inflammatory responses. *J Dent Res.* 1972; 51: 264 - 269.
 102. [Jaworek J](#), [Bonior J](#), [Leja-Szpak A](#), [Nawrot K](#), [Tomaszewska MR](#), [Stachura J](#), [Pawlik WW](#), [Konturek SJ](#). Sensory nerves in central and peripheral control of pancreatic integrity by leptin and melatonin. *J Physiol Pharmacol.* 2002 Mar; 53 (1): 51 - 74.
 103. Jones AC, Bentsen TY, Freedman PD. Mucormycosis of the oral cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993; 75: 41 - 47.
 104. Kawasaki H. Regulation of vascular function by perivascular calcitonin gene-related peptide-containing nerves. *Jpn J Pharmacol.* 2002; 88: 39 - 43.
 105. Kawasaki H., Nuki Ch., Saito A., Takasaki K. Role of calcitonin gene -

- related peptide - containing nerves in the vascular adrenergic neurotransmission. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990; 252 (1): 403 - 409.
106. Kempainen P, Avellan NL, Handwerker HO, Forster C. Differences between tooth stimulation and capsaicin-induced neurogenic vasodilatation in human gingiva. *J Dent Res.* 2003; 82, 4: 303 - 307.
107. Kerezoudis N.P, Fried K, Olgart L. Haemodynamic and immunohistochemical studies of rat incisor pulp after denervation and subsequent re-innervation. *Arch Oral Biol.* 1995; 40, 9: 815 - 823.
108. Kerezoudis N.P, Olgart L, Edwall L. CGRP (8-37) reduces the duration but not the maximal increase of antidromic vasodilatation in dental pulp and lip of the rat. *Acta Physiol Scand.* 1994; 151: 73 - 81.
109. Kerezoudis N.P, Olgart L, Edwall L. Differential effects of nitric oxide synthesis inhibition on basal blood flow and antidromic vasodilatation in rat oral tissues. *Eur J Pharmacol.* 1993; 241: 209 - 219.
110. Kerezoudis N.P, Olgart L, Edwall L. Evans blue extravasation in rat dental pulp and oral tissues induced by electrical stimulation of the inferior alveolar nerve. *Arch Oral Biol.* 1993; 38, 10: 893 - 901.
111. Kerezoudis N.P, Olgart L, Edwall L. Involvement of substance P but not nitric oxide or calcitonin gene-related peptide in neurogenic plasma extravasation in rat incisor pulp and lip. *Arch Oral Biol.* 1994; 39, 9: 769 - 774.
112. Kerezoudis N.P., Funato A, Edwall L, Olgart L. Activation of sympathetic nerves exerts an inhibitory influence on afferent nerve-induced vasodilatation unrelated to vasoconstriction in rat dental pulp. *Acta Physiol Scand.* 1993; 147: 27 - 35.
113. Kerezoudis N.P., Olgart L., Funato A., Edwall L. Inhibitory influence of sympathetic nerves on afferent nerve-induced extravasation in the rat incisor pulp upon direct electrical stimulation of the tooth. *Arch Oral Biol.* 1993b, 38: 483 - 490.
114. [Kerezoudis NP](#), [Olgart L](#), [Edwall L](#), [Gazelius B](#), [Nomikos GG](#). Activation of sympathetic fibres in the pulp by electrical stimulation of rat incisor teeth. *Arch Oral Biol.* 1992; 37 (12): 1013 - 1019.
115. [Konturek PC](#), [Brzozowski T](#), [Burnat G](#), [Kwiecien S](#), [Pawlik T](#), [Hahn EG](#), [Konturek SJ](#). Role of brain-gut axis in healing of gastric ulcers. *J Physiol Pharmacol.* 2004 Mar; 55 (1 Pt 2): 179 - 192.

116. [Konturek PC](#), [Brzozowski T](#), [Konturek SJ](#), [Pawlik M](#), [Gaca P](#), [Hahn EG](#), [Raithe M](#). Role of histamine in ghrelin-induced gastroprotection against acute gastric lesions. *Inflamm Res*. 2007 Apr; 56 Suppl 1: 25 - 26.
117. Konturek SJ, Pytko-Polończyk J, Brzozowski T, Bielanski W, Majka J. Healing of oral and gastric ulcers: effect of blood flow, epidermal growth factor and sensory innervation. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1993; 5 (suppl): 45 - 52.
118. [Konturek SJ](#), [Zayachkivska O](#), [Havryluk XO](#), [Brzozowski T](#), [Sliwowski Z](#), [Pawlik M](#), [Konturek PC](#), [Czesnikiewicz-Guzik M](#), [Gzhegotsky MR](#), [Pawlik WW](#). Protective influence of melatonin against acute esophageal lesions involves prostaglandins, nitric oxide and sensory nerves. *J Physiol Pharmacol*. 2007 Jun; 58 (2): 361 - 377.
119. Kostarczyk E. Badania podstawowe nad patofizjologią bólu zapalnego. *Nowiny Lekarskie* 2000; 69, 10, 815 - 833.
120. Kuchiiwa S, Kuchiiwa T. Autonomic and sensory innervation of cat molar gland and blood vessels in the lower lip, gingival and cheek. *J Auton Nerv Syst*. 1996; 61: 227 - 234.
121. Kusakabe T., Matsuda H., Gono Y., Kawakami T., Kurihara K., Tsukuda M., Takenaka T. Distribution of VIP receptors in the human submandibular gland: an immunohistochemical study. *Histol Histopathol*. 1998; 13: 373 - 378.
122. [Kwiecien S](#), [Brzozowski T](#), [Konturek PC](#), [Pawlik MW](#), [Pawlik WW](#), [Kwiecien N](#), [Konturek SJ](#). The role of reactive oxygen species and capsaicin-sensitive sensory nerves in the pathomechanisms of gastric ulcers induced by stress. *J Physiol Pharmacol*. 2003 Sep; 54 (3): 423 - 437.
123. Łasiński W. Anatomia głowy dla stomatologów. PZWL, Warszawa 1993.
124. Lee T.J.F., Saito A, Berezin I. Vasoactive intestinal polypeptide like substance. The potential transmitter for cerebral vasodilation. *Science (Wash. DO)* 1984, 224: 898 - 901.
125. Lembeck F. Zur frage der zentralen übertragung afferenter impulse. iii. Mitteilung. Das vorkommen und die bedeutung der substanz P in den dorsalen wurzeln des ruckenmarks. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1953; 219: 197 – 213.
126. Lewis T. The blood vessels of the human skin and their response. London 1927: Shaw.

127. Light AR. The initial processing of pain and descending control: spinal and trigeminal systems. In Gildenberg, PL (ed) 1992, Pain and headache, vol 12, Karger, Basel, New York, pp: 51 - 74.
128. Lilly JP, Fotos PG. Sjogrens syndrome: Diagnosis and management of oral complications. *Gen Dent.* 1996; 44: 404 - 408.
129. Long RG, Hlousek L, Doyle JL. Oral manifestations of systemic diseases. *Mt Sinai J Med.* 1998; 65 (5-6): 309 - 315.
130. Lotz M, Vaughan JH, Carson DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 1988; 2, 241 (4870): 1218 - 1221.
131. Lundberg J.M., Brodin E, Hua X, Saria A. Vascular permeability changes and smooth muscle contraction in relation to capsaicin-sensitive substance P afferents in the guinea-pig. *Acta Physiol Scand.* 1984; 120: 217 -227.
132. Lundberg JM, Anggard A, Fahrenkrug J, Hokfelt T, Mutt V. Vasoactive intestinal polypeptide in cholinergic neurons of exocrine glands: functional significance of co-existing transmitters for vasodilatation and secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 1651 - 1655.
133. Lundblad L, Saria A, Lundberg JM, Anggard A. Increased vascular permeability in rat nasal mucosa induced by substance P and stimulation of capsaicin-sensitive trigeminal neurons. *Acta Otolaryngol.* 1983; 96: 479 - 484.
134. Lundy FT, Linden GJ. Neuropeptides and neurogenic mechanisms in oral and periodontal inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15 (2): 82 - 98.
135. Luthman J, Friskopp J, Dahllof G, Ahlstrom U, Sjostrom L, Johansson O. Immunohistochemical study of neurochemical markers in gingival obtained from periodontitis-affected sites. *J Periodontal Res.* 1989; 24: 267 - 278.
136. Lynch MA, Ship II. Initial oral manifestations of leukaemia. *J Am Dent Assoc.* 1967; 75: 932 - 940.
137. Ma L, Wallace JL. Endothelial nitric oxide synthase modulates gastric ulcer healing in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000; 279: 341 -346.
138. Ma L., Chow J.Y.C., Wong B.C.Y., Cho C.H. Role of capsaicin sensory nerves and EGF in the healing of gastric ulcer in the rats. *Life Sci.* 2000, 66 (15), 213 - 220.

139. Madri JA, Bell L, Merwin JR. Modulation of vascular cell behavior by transforming growth factors beta. *Mol Reprod Dev.* 1992; 32: 121 - 126.
140. Maggi CA. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog Neurobiol.* 1995a; 45: 1 - 98.
141. Maggi CA. The mammalian tachykinin receptors. *Gen. Pharmacol.* 1995b; 26: 911 - 944.
142. Malara B, Joško J, Tyrpień M, Malara P, Stęplewska K. Dynamics of changes in vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and angiogenesis in stress-induced gastric ulceration in rat. *J Physiol Pharmacol.* 2005; 56, 2: 259 - 271.
143. Marfurt CF, Zalewski EM, Adams CE, Wether CL. Sympathetic nerve fibres in rat orofacial and cerebral tissues as revealed by the HRP-WGA tracing technique: a light and electron microscopic study. *Brain Res.* 1986; 366: 373 -378.
144. Matheny JL, Abrams H, Johnson DT, Roth GI. Microcirculatory dynamics in experimental human gingivitis. *J Clin Periodontol.* 1993; 20: 578 -583.
145. Matsson L, Norevall L-I, Forsgren S. Anatomic relationship between substance P and CGRP-immunoreactive nerve fibres and mast cells in the palatal mucosa of the rat. *Eur J Oral Sci.* 1995; 103: 70 - 76.
146. Matthews B, Robinson PP. The course of post-ganglionic sympathetic fibres distributed with trigeminal nerve in the cat. *J Physiol.* 1980; 303, 391 -401.
147. Merwin JR, Anderson J, Kocher O, vanItallie C, Madri JA. Transforming growth factor β 1 modulates extracellular matrix organization and cell-cell junctional complex formation during in vitro angiogenesis. *J Cell Physiol.* 1990; 142: 117 - 128.
148. Mori H, Ishida-Yamamoto A, Senba E, Ueda Y, Masaya T. Calcitonin gene-related peptide containing sensory neurons innervating tooth pulp and buccal mucosa of the rat. *J Chem Neuroanat.* 1990; 3: 155 - 163.
149. Nadoolman W, Duffy VB, Berger AM, Bartoshuk LM. Successive desensitization: a low pain/high dose technique for oral capsaicin delivery. *Chem Senses.* 1994; 19, 494.

150. Nanci A, Ten Cate AR. Ten Cates oral histology: development, structure and function. (6th edition)
151. Nazawa Y, Nishihara k, Yamamoto A, Nakano M, Ajioka H, Matsuura N. Distribution and characterization of vanilloid receptors in the rat stomach. *Neurosci. Lett.* 2001; 309: 33 - 36.
152. Norevall LI, Forsgren S. NPY/sympathetic and NPY/VIP innervation of the blood vessels supplying rat tooth-related structures: effects of sympathectomy. *Neuropeptides* 1999; 33 (3), 216 - 226.
153. Nowak B; Obuchowicz R. Włókna czuciowe typu C-znaczenie w fizjologii oraz patologii błony śluzowej jamy ustnej. *Dent. Med. Prob.* 2005; 42, 3:489 - 496.
154. [Obuchowicz R](#), [Pawlik MW](#), [Brzozowski T](#), [Konturek SJ](#), [Pawlik WW](#). Involvement of central and peripheral histamine H(3) receptors in the control of the vascular tone and oxygen uptake in the mesenteric circulation of the rat. *J Physiol Pharmacol.* 2004 Mar; 55 (1 Pt 2): 255 - 267.
155. Oglivie RW, Gillian LA, Knapp DE. Physiological evidence for he presence of vasoconstrictor fibres in the dental pulp. *J Dent Res* 1966; 45: 980 -988.
156. Oglivie RW. Direct observation of the cat dental pulp microvascular response to electrical and drug stimuli. *Anat Rec.* 1967; 157: 379 - 385.
157. Okabe E., Todoki K. Ito H. Direct pharmacological action of vasoactive substances on pulpal blood flow: an analysis and critique. *J. Endod.* 1989, 15: 473 - 477.
158. Olgart L, Krezoudis NP. Nerve-pulp interaction. *Arch Oral Biol* 1994; 39 suppl:47 - 54.
159. Olgart L. Neural control of pulpal blood flow. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996; 7 (2): 159 - 171.
160. [Olgart LM](#), [Edwall B](#), [Gazelius B](#). Neurogenic mediators in control of pulpal blood flow. *J Endod.* 1989 Sep; 15 (9): 409 - 412. Review.
161. [Pawlik M](#), [Ptak A](#), [Pajdo R](#), [Konturek PC](#), [Brzozowski T](#), [Konturek SJ](#). Sensory nerves and calcitonin gene related peptide in the effect of ischemic preconditioning on acute and chronic gastric lesions induced by ischemia-reperfusion. *J Physiol Pharmacol.* 2001 Dec; 52 (4 Pt 1): 569 - 581.
162. [Pawlik W](#), [Shepherd AP](#), [Jacobson ED](#). Effect of vasoactive agents on

- intestinal oxygen consumption and blood flow in dogs. *J Clin Invest.* 1975 Aug; 56 (2): 484 - 489.
163. [Pawlik W](#), [Shepherd AP](#), [Mailman D](#), [Jacobson ED](#). Effects of ouabain on intestinal oxygen consumption. *Gastroenterology.* 1974 Jul; 67 (1): 100 - 106.
164. Pawlik W.W., Hottenstein O.D., Jacobson E.D. Adrenergic modulation of reactive hyperemia in rat gut. *Am J Physiol.* 1991; 261: 392 - 400.
165. Pawlik W.W., Sendur R. Mechanizmy kontroli krążenia krezkowego przez nerwy czuciowe. *Kardiol. Pol.* 1998; 48 (II): 102.
166. [Pawlik WW](#), [Fondacaro JD](#), [Jacobson ED](#). Metabolic hyperemia in canine gut. *Am J Physiol.* 1980 Jul; 239 (1): 12 - 17.
167. [Pawlik WW](#), [Obuchowicz R](#), [Biernat J](#), [Sendur R](#), [Jaworek J](#). Role of calcitonin gene related peptide in the modulation of intestinal circulatory, metabolic, and myoelectric activity during ischemia/reperfusion. *J Physiol Pharmacol.* 2000 Dec; 51 (4 Pt 2): 933 - 942.
168. [Pawlik WW](#), [Obuchowicz R](#), [Pawlik MW](#), [Sendur R](#), [Biernat J](#), [Brzozowski T](#), [Konturek SJ](#). Histamine H₃ receptors modulate reactive hyperemia in rat gut. *J Physiol Pharmacol.* 2004 Sep; 55 (3): 651 - 661.
169. [Pawlik WW](#), [Thor P](#), [Sendur R](#), [Biernat J](#), [Koziol R](#), [Wasowicz P](#). Myoelectric bowel activity in ischemia/reperfusion damage. Role of sensory neurons. *J Physiol Pharmacol.* 1998 Dec; 49 (4): 543 - 551.
170. [Payan DG](#), [Brewster DR](#), [Goetzl EJ](#). Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. *J Immunol.* 1983 Oct; 131 (4): 1613 - 1615.
171. Price TJ, Louria MD, Candelario D, Dussor GO, Jeske NA, Patwardhan AM, Diogenes A, Trott AA, [Hargreaves KM](#), Flores CM. Treatment of trigeminal ganglion neurons in vitro with NGF, GDNF or BDNF: effects on neuronal survival, neurochemical properties and TRPV mediated neuropeptide secretion. *Neuroscience* 2005; 6: 4.
172. Quaedackers J.S.L.T., Beuk R.J., Bennet L., Charlton A., Egbrink M.G.A., Gunn, Heineman E. An evaluation of methods for grading histologic injury following ischemia/ reperfusion of the small bowel. *Transplant Proc.* 2000; 32: 1307 - 1310.

173. Quayle JM, Bonev AD, Brayden JE, Nelson MT. Calcitonin gene-related peptide activated ATP-sensitive K⁺ currents in rabbit arterial smooth muscle via proteine kinase. *A J Physiol.* 1994; 475: 9 - 13.
174. Ramieri G, Anselmetti GC, Baracchi F, Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Modica R. The innervation of human teeth and gingival epithelium as revealed by means of an antiserum for protein gene product 9.5 (PGP 9.5). *Am J Anat.* 1990; 189: 146 - 154.
175. Rees TD. The diabetic dental patient. *Dent Clin North Am.* 1994; 38 (3): 447 - 463.
176. Rodd HD, Boissonade FM. Comparative immunohistochemical analysis of the peptidergic innervation of human primary and permanent tooth pulp. *Arch Oral Biol.* 2002; 47: 375 - 385.
177. [Rogers LA](#), [Atkinson RA](#), [Long JP](#). Responses of isolated perfused arteries to catecholamines and nerve stimulation. *Am J Physiol.* 1965 Aug; 209: 376 - 382.
178. Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, River J, Vale WW, Evans RM. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin via tissue-specific RNA processing. *Nature* 1983; 303: 129 - 135.
179. Ross WF, Salisbury PL. Uremic stomatitis associated with undiagnosed renal failure. *Gen Dent.* 1994; 9/10: 410 - 412.
180. Sabate MI, Stolarsky LS, Polak JM, Bloom SR, Varndell IM, Ghatei MA, Evans RM, Rosenfeld MG. Regulation of neuroendocrine gene expression by alternative RNA processing. Colocalization of calcitonin and calcitonin gene-related peptide in thyroid C-cells. *J Biol Chem.* 1985; 260, 2589 - 2592.
181. Satoh-Kuriwada S, Sasano T, Date H, Karita k, Izumi H, Shoji N, Hashimoto K. Centrally mediated reflex vasodilatation in the gingival by painful tooth-pulp stimulation in sympathectomized human subject. *J Periodontol Res.* 2003; 38, 2: 21
182. Scardina GA, Carini F, Messina P. Vasodilatation of human gingiva and neurogenic inflammation. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2005; 32: 279 - 285.
183. Schmassmann A, Tarnawski A, Peskar BM, Varga L, Flogerzi B, Halter F. Influence of acid and angiogenesis on kinetics of gastric ulcer healing in rats: interaction with indomethacin. *Am J Physiol.* 1995; 268: 276 - 285.
184. Schmidt P., Poulsen S.S., Rasmussen T.N. Bersani M., Hoist J.J. Substance P

- and neurokinin A are codistributed and colocalized in the porcine gastrointestinal tract. *Peptides* 1991, 12: 963 - 973.
185. Seftor REB, Seftor EA, Gehlsen KR, Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Rouslahti E, Hendrix MJC. Role of the $\alpha\beta 3$ integrin in human melanoma cell invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1157 - 1561.
186. Seno K., Lam K., Leung J.W.C., Leung F.W. Primary afferent nerves mediate in part β - adrenoceptor stimulation - induced mesenteric hyperemia in rats. *Life Sci.* 1996; 59 (15): 1203 - 1209.
187. Shen Y-T., Pittman T.J., Buie P.S., Boldue D.L., Kane S.A., Koblan K.S., Gould R.J., Lynch J.L. Functional role of α - calcitonin gene - related peptide in the regulation of the cardiovascular system. *Pharmacolgy* 2001; 298, 2: 551 - 558.
188. Shepherd A.P., Pawlik W., Mailman D., Burks T.F., Jacobson E.D. Effects of vasoconstrictors on intestinal vascular resistance and oxygen exygen extraction. *Am J Physiol.* 1976; 230 (2): 298 - 305.
189. Shibata H, Mio M, Tasaka K. Analysis of the mechanism of histamine-release induced by substance P. *Biochim Biophys Acta* 1985; 846: 1 - 7.
190. Shiraki H., Kawasaki H., Tezuka S., Nakatsuma A., Kurosaki Y. Endogenous calcitonin gene - related peptide (CGRP) mediates adrenergic - dependent induced by nicotine in mesenteric resistance arteries of the rat. *Br J Pharmacol.* 2000; 130: 1083 - 1091.
191. Sinnatamby CS. *Lasts anatomy: regional and applied.* 1999, 10th ed. Edinburgh: Churchil Livingstone.
192. Song-Ping H., Naes L., Westfall T.C. Calcitonin gene - related peptide is the endogenous mediator of nonadrenergic - noncholinergic vasodilation in rat mesentery. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990; 255 (2): 423 - 428.
193. [Southwell BR](#), [Woodman HL](#), [Murphy R](#), [Royal SJ](#), [Furness JB](#). Characterisation of substance P-induced endocytosis of NK1 receptors on enteric neurons. *Histochem Cell Biol.* 1996 Dec; 106 (6): 563 - 571.
194. [Szolcsanyi J](#), [Bartho L](#). Capsaicin-sensitive afferents and their role in gastroprotection: an update. *Physiol Paris.* 2001 Jan-Dec;95 (1-6): 181 - 188.
195. [Szolcsanyi J](#), [Jancso-Gabor A](#). Sensory effects of capsaicin congeners I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. *Arzneimittelforschung.* 1975; 25 (12): 1877 - 1881.
196. [Szolcsanyi J](#). Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and

- systemic efferent functions: facts and scopes of an unorthodox neuroregulatory mechanism. *Prog Brain Res.* 1996; 113: 343 - 359. Review
197. Taguchi T., Kawasaki H., Imamura T., Takasaki K. Endogenous calcitonin gene -related peptide mediates nonadrenergic noncholinergic depressor response to spinal cord stimulation in the pithed rat. *Circ Res.* 1992; 71: 357 - 364.
 198. Takanaga M., Kawasaki H., Wada A., Eto T. Calcitonin gene related peptide mediates acetylcholine - induced endothelium- independent vasodilation in mesenteric resistance blood vessels of the rat. *Circ Res.* 1995; 76: 935 - 941.
 199. Takenaga M., Kawasaki H. Endogenous calcitonin gene - related peptide suppresses vasoconstriction mediated by adrenergic nerves in rat mesenteric resistance blood vessels. *Eur J Pharmacol.* 1999; 367: 239 - 245.
 200. Tarnawski A, Hollander D, Stachura J, Krause WJ, Eltorai M, Dabros W. Vascular and microvascular changes: key factors in the development of acetic acid-induced gastric ulcers in rats. *J Clin Gastroenterol.* 1990;12 (suppl): 148 -157.
 201. Tarnawski A, Stachura J, Krause WJ, Douglass TG, Gergely H. Quality of gastric ulcer healing: a new, emerging concept. *J Clin Gastroenterol.* 1991; 13: 42 - 47.
 202. Taylor PE, Byers MR, Redd PE. Sprouting of CGRP nerve fibres in response to dentin injury in rat molars. *Brain Res.* 1988; 461: 371 - 376.
 203. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002; 420: 853 - 859.
 204. Trantor IR, Birner R. The effects of neuropeptides (calcitonin gene-related peptide and substance P) on cultured human pulp cells. *J Dent Res.* 1995; 74: 1066 - 1077.
 205. Tsukimi Y, Nakai H, Amagase K, Okabe S. Involvement of heat shock proteins in the healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rat. *J Physiol Pharmacol.* 2001; 52, 3: 391 - 406.
 206. Uddman R, Edvinsson L, Ekman R, Kingman T, McCulloch J. Innervation of the feline cerebral vasculature by nerve fibres containing calcitonin gene-related peptide: Trigeminal origin and co-existence with substance P. *Neurosci Lett.* 1985; 62: 131 - 136.
 207. Ulrich-Lai YM, Flores CM, Harding-Rose CA, Goodis HE, Hargreaves KM. Capsaicin-evoked release of immunoreactive calcitonin gene-related

- peptide from rat trigeminal ganglion: evidence for intraganglionic neurotransmission. *Pain* 2001; 91: 219 - 226.
208. Urman JD, Lowenstein MB, Ables M, Weinstein A. Oral mucosal ulceration in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1978; 21: 58 - 61.
209. van der Waal RI, Buter J, van der Waal I. Oral metastases: Report of 24 cases. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 41: 3 - 6.
210. Vandevska-Radunovic V, Fristad I, Wimalawansa SJ, Hals Kvinnsland I. CGPR1 and NK1 receptors in postnatal, developing rat dental tissues. *Eur J Oral Sci.* 2003; 111: 497 - 502.
211. Verdickt GM, Abbot PV. Blood flow changes in human dental pulps when capsaicin is applied to the adjacent gingival mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 92: 561 - 565.
212. Wakisaka S. Neuropeptides in the dental pulp: distribution, origins and correlations. *J Endodont.* 1990; 16: 67 - 69.
213. Walocha J, Skawina A, Gorczyca J. *Anatomia prawidłowa człowieka. Szyja i głowa.* Wydawnictwo UJ, Kraków 2003.
214. Whittle B.J.R., Lopez-Belmonte J., Moncada S. Regulation of gastric mucosal integrity by endogenous nitric oxide: interactions with prostanoids and sensory neuropeptides in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 1990; 99: 607 - 611.
215. Williams AJK, Wray D, Ferguson A. The clinical entity of orofacial Crohn-disease. *Q J Med* 1991; 289: 451 - 458.
216. Wimalawansa SJ, Emson PC, MacIntyre I. Regional distribution of calcitonin gene-related peptide and its specific binding sites in rats with particular reference to the nervous system. *Neuroendocrinology* 1987; 46: 131 - 136.

