

УНИВЕРЗИТЕТ “СВЕТИ КИРИЛ И МЕТОДИЈ”
СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ - СКОПЈЕ
Клиника за детска и превентивна стоматологија

АНА С. СОТИРОВСКА-ИВКОВСКА

**ПРОЦЕНКА НА ИМУНОЛОШКИОТ ОДГОВОР НА
ПУЛПИНОТО ТКИВО КАЈ НЕКАРИОЗНИ И КАРИОЗНО
ПРОМЕНЕТИ ЗАБИ ВО ДЕТСКА ВОЗРАСТ: КЛИНИЧКА,
МОРФОЛОШКА И ИМУНОХИСТОХЕМИСКА СТУДИЈА**

докторска дисертација

ментор: Проф. д-р сци. Бона Бајрактарова

Скопје, 2001

АПСТРАКТ

Забниот кариес е најчеста причина за заболување на пулпата при што продуктите од бактерискиот метаболизам предизвикуваат воспалителен и имунолошки одговор. Соодносот помеѓу одбранбените реакции на пулпата и длабочината на кариозните лезии се испитувани за да се разбере, како и кои воспалителни и имунокомпетентни клетки ја инфилтрираат пулпата во однос на длабочината на кариозната лезија за да се разјасни патогенезата на денталниот кариес и да се овозможи конзервативен третман на заболувањата на пулпата.

Во оваа студија, состојбата на пулпиното ткиво е класифицирана според длабочината на кариозната лезија при што во секој стадиум поединечно се прикажани промените во квантитетот и квалитетот на воспалителните и имунокомпетентните клетки.

Анализите се направени на 30 здрави и 120 пулпини ткива, добиени од заби со различен степен на прогресија на кариозната лезија. Забите се класифицирани во пет групи според длабочината на кариозната лезија, и тоа: здрави заби, заби со *caries superficialis*, заби со *caries media*, заби со *caries profunda* и *pulpitis*. За да се стекне увид во квалитетот и квантитетот на пулпиниот имунолошки одговор направени се имунохистохемиски испитувања со аплицирање на 6 моноклонални антители, насочени кон: сите Т лимфоцити (UCHL-1, *DAKO Co. Ltd, Denmark*), кон хелперните (CD4) и супресорните (CD8) Т лимфоцити, кон Б лимфоцитите (CD20), кон макрофагите (CD68) и кон дендритичните клетки (HLA-DR). Лимфоцитите, плазма клетките, гранулоцитите и имунохистохемиските позитивно обоени клетки со помош на имунопероксидазната техника за секое поединечно специфично антители, беа броени на светлосен микроскоп (*BH2, Olympus*) на зголемување од 200 пати.

Средните вредности добиени од анализата на клетките кај здрави заби и кај различните стадиуми од прогресијата на кариозната лезија, статистички се анализирани со помош на параметриски и непараметриски дескриптивни методи.

Кај здравите пулпини ткива детектирани се ретки, поединечни позитивни Т лимфоцити, дендритични клетки и макрофаги, а кај забите со *caries superficialis* бројот на клетките лесно се зголемува, при што е забележано присуство на ретки позитивни Б лимфоцити.

Кај *caries media* бројот на клетките уште повеќе се зголемува, и при тоа во овој стадиум е идентифицирано присуство и на гранулоцити и на плазма клетки. Кај *caries profunda* се забележува драстично зголемување на бројот на сите анализирани воспалителни и имунокомпетентни клетки со значителен пораст на Б лимфоцитите. Забите со експонирана пулпа (*pulpitis*) покажуваат енормно зголемување на бројот на сите воспалителни и имунокомпетентни клетки со преминација на Б клеточната популација.

Здравата, човечка пулпа е добро адаптирана на својата непосредна околина и поседува доволен број одбранбени клетки што при афекција на пулпата можат соодветно да одговорат на штетните стимуланти.

Кај пулпините ткива зафатени со *caries superficialis* и *caries media* се забележува фокална акумулација на моноклеарен воспалителен инфилтрат со однос помеѓу $CD4/CD8$ Т лимфоцитите од 0.22, односно 0.23 и однос на Б/Т лимфоцитите од 0.21, односно 0.24.

Кај *caries profunda* односот $CD4/CD8$ е повисок и изнесува 0.84, а Б/Т односот е 0.57. Ваквиот однос на клетките укажува на реверзибилно оштетување на пулпата и е индикација за преземање на адекватен конзервативен третман.

Кај *pulpitis* високиот однос на $CD4/CD8$ лимфоцитите од 1.22 и односот на Б/Т лимфоцитите од 1.81 укажува на иреверзибилно оштетување на пулпиното ткиво.

Резултатите од оваа теза го подржуваат концептот дека раниот третман на кариозната лезија претставува биолошки рационален пристап со што се спречува состојбата која го надминува природниот одбранбен потенцијал на пулпиното ткиво во справувањето со антигените од кариозната лезија.

Клучни зборови: забен кариес, хумана дентална пулпа, имунохистохемија, имунокомпетентни клетки

ABSTRACT

Dental caries is the most common cause of pulp disease, in which products of bacterial metabolism elicit inflammatory and immunological reaction. The relation between the defensive reactions of the pulp and the depth of carious lesions are examined, to understand how and which inflammatory and immunocompetent cells infiltrate the pulp in association with the development of carious lesion in order to elucidate the pathogenesis of dental caries, especially from the viewpoint of conservative treatment of pulp disease.

In this study, we classified the stages of pulp inflammation with carious lesion according to the depth of the lesion and summarized the changes in the inflammatory and immunocompetent cells at each stage.

We have analyzed 30 non-carious and 120 teeth with different stages of progression of the carious lesion. The condition of the pulp tissue was classified into five groups according to the depth of the carious lesion: non-carious teeth, caries superficialis, caries media, caries profunda and pulpitis. In order to understand the quantitative and qualitative changes in the pulpal immune defense, the indirect immunoperoxidase staining procedures were performed with six monoclonal antibodies reactive with: pan-T lymphocytes, (UCHL-1, DAKO Co. Ltd, Denmark), T helper (CD4) lymphocytes, T suppressor (CD8) lymphocytes, B lymphocytes (CD20), macrophages (CD68) and dendritic cells (HLA-DR). Lymphocytes, plasma cells, neutrophils and immunostained cells for each specific antibody were counted under light microscope (BH2, Olympus) at a magnification of x200.

Mean values of the analyzed cells in the non-carious group and in those with caries at different stages of carious lesion progression were statistically analyzed with parametric and non-parametric methods.

A few scattered positive T lymphocytes, dendritic cells, and macrophages were detected in normal dental pulp tissue. The number of these cells in the group with caries superficialis was slightly increased and also a few positive B lymphocytes were present.

In the group with caries media the number of the analyzed cells was markedly increased, and also in this stage a few granulocytes and plasma cells were identified. In the caries profunda group, in the pulp tissue, the number of all inflammatory and immunocompetent cells was dramatically increased. Teeth with exposed pulp (pulpitis) were showing extremely high number of all inflammatory and immunocompetent cells, with the predominance of B cell population.

Healthy human dental pulp is well adapted to its surrounding and possesses sufficient number of defence cells, which are capable of proper response to harmful stimuli affecting the pulp.

In the caries superficialis and caries media group, in the pulp tissue a focal accumulation of mononuclear inflammatory infiltrate can be detected, with the ratio of CD4/CD8 0.22 and 0.23, respectively. The ratio of B/T lymphocytes was 0.21 and 0.24, respectively.

In the caries profunda group the ratio of CD4/CD8 was 0.84 and the ratio of B/T lymphocytes was 0.57. Such values of the ratios between the analyzed cells are showing the reversible pulp pathosis, and imposes an adequate conservative treatment of the affected teeth.

In the group with exposed pulp (pulpitis) a high ratio of CD4/CD8 and B/T lymphocytes was observed (1.22 and 1.81, respectively), showing signs of irreversible pulp pathosis.

The results from this thesis are supporting the concept that early treatment of the carious lesion will be biologically rational approach, because it may help the tooth to use its natural defence potential to overwhelm the carious antigenic challenges.

Key words: dental caries, human dental pulp, immunohistochemistry, immunocompetent cells

Содржина:

1. ВОВЕД	1
2. ЛИТЕРАТУРЕН ПРЕГЛЕД	2
2. 1. Анатомија и хистомофрологија на пулпата.....	2
2.2. Кариес.....	8
2. 2.1. Микробиологија на кариесот.....	8
2.2.2. Клинички и патолошки карактеристики на забниот кариес.....	12
2.2.3. Одговор на пулпиното ткиво од бактериска инфекција.....	15
2.3. Начини на инфекција на пулпата.....	18
2.4. Одбранбени реакции на пулпата	18
2.4.1. Намалување на пермеабилитетот на дентинот	18
2.4.2. Формирање на нов дентин (репараторен дентин).....	19
2.4.3. Воспалителни реакции на пулпиното ткиво.....	19
2.4.3.1. Општи карактеристики на воспалителната реакција.....	19
2.4.3.2. Инфламаторен одговор на пулпиното ткиво.....	22
2.4.4. Имунолошки реакции на пулпиното ткиво.....	25
2.4.4.1. Клетки и ткива на имунолошкиот систем	25
2.4.4.2. Вроден имунолошки систем	25
2.4.4.3. Стекнат имунолошки систем.....	26
2.4.4.4. Лимфоцити.....	27
2.4.4.5. Б лимфоцити.....	28
2.4.4.6. Т лимфоцити.....	29
2.4.4.7. Клетки природни убијци (<i>Natural killer cells</i> - NK).....	31
2.4.4.8. Системот на комплемент.....	32
2.5. Имунолошки аспекти на денталниот плак, кариесот и пулпината инфекција.	32
2.5.1. Имунолошки аспекти на денталниот плак.....	32
2.5.2. Имунолошки аспекти на денталниот кариес.....	34
2.5.3. Имунолошки аспекти на пулпината инфекција.....	35
2.6. Имунохистохемиски испитувања на пулпата	37
3. МОТИВ ЗА ИЗРАБОТКА НА ТЕЗАТА	42
4. ЦЕЛИ НА ТЕЗАТА	42
5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ	43
5.1. Клинички испитувања	44
5.2. Светлосно-микроскопски испитувања	45

5.3. Имунохистохемиски испитувања.....	45
6. РЕЗУЛТАТИ.....	48
6.1. Резултати од клиничките испитувања	48
6.2. Резултати од светлосно-микроскопските испитувања	49
6.3. Резултати од имунохистохемиските испитувања	54
6.3.1. Дистрибуција на Т лимфоцити.....	54
6.3.2. Дистрибуција на T_h (<i>CD4</i>) лимфоцити.....	55
6.3.3. Дистрибуција на T_s (<i>CD8</i>) лимфоцити.....	56
6.3.4. Однос помеѓу T_h/T_s (<i>CD4/CD8</i>) лимфоцити.....	57
6.3.5. Дистрибуција на Б (<i>CD20</i>) лимфоцити.....	58
6.3.6. Однос помеѓу Б и Т лимфоцити.....	59
6.3.7. Дистрибуција на дендритични клетки (<i>HLA-DR</i>).....	60
6.3.8. Дистрибуција на макрофаги (<i>CD68</i>).....	61
7. ПРИКАЗ НА ПОЕДИНЕЧНИ СЛУЧАИ ОД АНАЛИЗИРАНИОТ МАТЕРИЈАЛ.....	62
8. ДИСКУСИЈА.....	68
8.1. Хистопатолошки промени во пулпата регистрирани под светлосен микроскоп.....	69
8.2. Имунохистохемиска анализа.....	78
8.2.1. Т лимфоцити	79
8.2.2. Б лимфоцити.....	81
8.2.3. Дендритични клетки и макрофаги	84
9. ЗАКЛУЧОЦИ.....	90
10. ИДНИ ПЕРСПЕКТИВИ ВО ИСТРАЖУВАЊАТА НА ЗАБОЛУВАЊАТА НА ПУЛПАТА.....	93
11. ЛИТЕРАТУРА	95

1. ВОВЕД

Забната пулпа е меко ткиво од мезенхимално потекло, сместена во пулпината комора и корените на забите. На нејзината периферија има слој од високо специјализирани клетки, одонтобласти. Блискиот сооднос на одонтобластите и дентинот е една од неколкуте причини, зошто дентинот и пулпата се сметаат за функционална целина, која се нарекува пулподентински комплекс. Пулпата поседува одредени специфичности поради нејзината локализација. Таа е сместена во ригиден, минерализиран дентин. Во оваа средина се ограничени можностите за зголемување на волуменот при епизодите на вазодилатација и зголемена васкуларна пермеабилност, и при вакви ситуации, регулацијата на протокот на крв е од најголемо значење.⁵⁹

Денталната пулпа е сврзано ткиво со свои специфични карактеристики што се од суштинско значење за нејзината функција и опстанок. Дури и зрелата пулпа има сличности со ембрионалното сврзано ткиво, а сепак на нејзината периферија има слој од високо специјализирани клетки, одонтобласти. Пулпината комора е исполнета со нерви, васкуларно ткиво, влакна, основна супстанција, интерстицијална течност, одонтобласти, фибробласти и други минорни целуларни компоненти. Вкупниот волумен на крвта во пулпината комора не може да се зголеми, иако реципрочни промени на волуменот се можни помеѓу артериолите и венулите, бидејќи сите овие составни делови се релативно некомпресибилни. Циркулаторниот систем на пулпата е всушност микроциркулаторен систем, чии најголеми васкуларни компоненти се артериоли и венули. За разлика од многу ткива, нејзе и недостасува вистински колатерален систем и е зависна од артериолите кои влегуваат низ отворот на коренот на забот и поединечни артериоли кои влегуваат низ латералните каналчиња.¹³

Пулпата претставува уникатен сензорен орган. Таа е опкружена со протективен слој на дентин кој е покриен со емајл, при што може да се очекува дека таа воопшто не реагира на надворешни стимулации. Меѓутоа, и покрај ниската термичка кондуктивност на емајлот и дентинот, пулпата е осетлива на термички дразби, топло-ладно.

Таа ја задржува способноста да формира дентин и после формирањето на забот, се додека е зачуван нејзиниот виталитет, а може и делумно да ја надокнади загубата од емајл и дентин, причинети со механичка траума или болест.¹³⁰

2. ЛИТЕРАТУРЕН ПРЕГЛЕД

2. 1. АНАТОМИЈА И ХИСТОМОФРОЛОГИЈА НА ПУЛПАТА

Хистолошки пулпата е организирана во неколку зони. Во здрава пулпа, најповршниот слој клетки е претставен од **одонтобластите**. Тој е локализиран непосредно до предентинот, при што во коронарната пулпа се содржат повеќе клетки на единица површина, отколку во радикуларната пулпа. Одонтобластите во коронарната пулпа се обично цилиндрични, во средината на радикуларната пулпа се повеќе кубоидални, а во близина на апикалниот отвор се со вретенест изглед.

Помеѓу соседните одонтобласти постојат три вида на специјализирани дезмозомски врски преку кои се поврзуваат клетките. Макула атхеренс (*Macula adherens*) е локализирана во апикалниот дел од телото на одонтобласната клетка и таа механички ги поврзува одонтобластите. Нексуси (*nexus*) - обезбедуваат патишта по кои може да се шири електричната дразба помеѓу одонтобластите, и овие врски се најбројни за време на формирањето на примарниот дентин. Зонула оклуденс (*zonula occludens*) најчесто се наоѓа во апикалниот дел од одонтобласниот слој кај млади заби. Овие структури се состојат од линеарни испакнатини и вдлабнатини, што го затвараат интерцелуларниот простор. По се изгледа овие врски ја одредуваат пермеабилноста на одонтобласниот слој со рестрикција на минувања на молекули, јони и течност помеѓу екстрацелуларниот простор на пулпата и предентинот. Овој слој го сочинуваат само тела на клетки, бидејќи одонтобласните продолжоци навлегуваат во дентинските тубули. Освен одонтобластите овде може да се најдат и дендритични клетки, капилари и нервни завршоци.¹⁶⁷

Втората зона ја сочинува тесен слој, **сиромашен со клетки**. Веднаш под одонтобласниот слој во коронарната пулпа често се наоѓа тесна зона, од околу 40 μm во дебелина, која е релативно безклеточна. Низ неа поминуваат крвни капилари, немиелинизирани нервни влакна и цитоплазматски продолжоци на фибробластите. Присуството или отсуството на оваа зона зависи од функционалниот статус на пулпата. Кај млада и активна пулпа која интензивно формира дентин оваа зона може и да ја нема.

Третата зона ја сочинува **слој богат со клетки**. Тука во поголем процент се застапени фибробласти во споредба со централниот дел на пулпата. Оваа зона е поназначена во коронарната пулпа одошто кај радикуларната пулпа. Исто така може да се сретнат недиференцирани (резервни) клетки, макрофаги и лимфоцити. При иреверзибилно оштетување на одонтобластите тие се заменуваат со клетки коишто од оваа зона мигрираат во одонтобласниот слој.

Четвртата зона е **пулпината строма**, која го опфаќа централниот дел на пулпата. Таа ги содржи поголемите крвни садови и нерви, а од клетките се застапени фибробластите (пулпини клетки).^{13,59}

Клеточните елементи на пулпата имаат големо значење за нејзиното функционирање. Во прв ред тоа се **одонтобластите**, кои се високодиференцирани клетки, со важна улога во функцијата, како на пулпата така и на дентинот. Нивното тело лежи непосредно до неминерализираниот дентински матрикс (предентин), а продолженијата се протегаат низ тубулите во предентинот и дентинот. Тие се одговорни за дентиногенезата од почетокот на формирањето на забот, па се додека е зачуван виталитетот на пулпата.^{13,59}

Одонтобластите создаваат матрикс кој е составен од колагени влакна и протеоглици кои што се подложни на процесот на минерализација. Најголемиот дел од колагенот што тие го создаваат е од типот *I*, и мала количина на тип *V* колаген. Одредени автори претпоставуваат дека колагенот тип *I* може да игра улога во процесот на минерализација.²⁰ Покрај тоа тие синтетизираат *фосфофорин* (фосфопротеин кој е вклучен во екстрацелуларната минерализација), а тој се наоѓа единствено во дентинот и го нема во ни една друга клетка од мезенхимално потекло.²¹

Ултраструктурните карактеристики на телата на одонтобластите покажуваат високо специјализиран зрнест ендоплазматски ретикулум, назначен Голџиев апарат, секреторни гранули и бројни митохондрии. Исто така овие клетки се богати со рибонуклеинска киселина (РНК) и нивното јадро содржи едно или повеќе јадренца. Всушност, ова се главните карактеристики на клетки што продуцираат протеини. Одонтобласните продолженија се составени од микротубули и микрофиламенти, а тие се поставени најчесто надолжно. Според едни автори,² тие се простираат низ целата дебелина на дентинот, а според други автори тие се простираат само до внатрешната третина од дебелината на дентинот.^{18,151}

Очевидно, овој проблем заслужува понатамошно истражување, особено од аспект на неговото клиничкото значење, бидејќи употребата на високо туражни машини може да ги оштети одонтобласните продолженија.

Најзастапени клетки во пулпата се **фибробластите**. Тие се распоредени насекаде во пулпата, но се најбројни во зоната богата со клетки. Нивната меѓусебна поврзаност се обезбедува со бројни продолженија кои излегуваат од секоја клетка. Многу од овие контакти заземаат форма на меѓуклеточни мостови и овозможуваат јака електрична поврзаност помеѓу клетките. Тие се специфично ткивни клетки коишто ако добијат соодветен сигнал можат да се диференцираат во одонтобласти. Овие клетки ги создаваат и

разградуваат колагените фибрили на пулпата и се одговорни за метаболизмот на колагенот. Со зголемување на бројот на крвни садови, нервни влакна и фибрили има релативно намалување на бројот на фибробластите во пулпата. Тие остануваат во релативно недиференциран облик споредени со фибробластите во другите сврзни ткива.^{13,59} Во незрелите фибробласти, органелите се во рудиментирана форма на развој, додека зрелите фибробласти имаат ѕвездеста форма, при што Голџиевиот апарат се зголемува, зрнестиот ендоплазматски ретикулум пролиферира, се појавуваат секреторни везикули и тие добиваат карактеристична форма на клетки коишто создаваат и секретираат протеини. Важни клетки за неспецифичната и специфичната одбрана се **макрофагите**.⁸⁸ Тие се моноцити што го напуштиле крвотокот и навлегле во ткивото, диференцирајќи се во макрофаги. Имаат способност за фагоцитоза и земаат учество во имунолошкиот одговор како помошни клетки кои го обработуваат и презентираат антигенот на лимфоцитите.^{11,49} Обработениот антиген се врзува за Класа II од хистокомпатибилниот комплекс на макрофагот и така поврзан понатаму може да се врзе за специфичниот рецептор присутен на имунокомпетентните Т клетки. Ваквата интеракција е неопходна за индукција на клеточниот имунитет. Макрофагите создаваат низа солубилни фактори, како што се Интерлеукин I и други цитокини.

Покрај макрофагите, како помошни клетки на имунолошкиот систем се среќаваат и **дендритичните клетки** (антиген презентирачки клетки). Заедно со макрофагите и лимфоцитите, дендритичните клетки учествуваат во имунолошкиот надзор на пулпата. Тие се карактеризираат со дендритични цитоплазматски продолженија и присуство на HLA класа II антигени на клеточната површина.^{11,49} Jontell и сор.(1996) сметаа дека тие се под влијание на нервно-васкуларните структури. Докажале дека нивните дендритични продолженија се во тесен физички контакт со капиларните крвни садови и нервните влакна, при што формираат тродимензионална структура околу капиларните крвни садови што наликува на клеточна "мрежа". Овој структурен сооднос помеѓу дендритичните и ендотелните клетки може да биде од исклучителна важност во процесот на периферната презентација на антигените на Т клетките (клетки кои паметат).

Jontell и сор.(1987) известуваат дека од **лимфоцитната лоза**, во здрава неинфламирана пулпа присутни се Т **лимфоцитите**, претежно CD8 (*cytotoxic/suppressor cells*) и во помал број CD4 (*helper/inducer cells*). Б лимфоцитите не се идентификувани во ниеден од испитаните примероци. Нивните испитувања покажале дека хуманата дентална пулпа е добро снабдена со имунокомпетентни клетки способни да иницираат имунолошки одговор. Меѓутоа, Hahn и сор.(1989) во својата

студија за Т и Б клетките во здрава пулпа, нашле присуство на Б лимфоцити, но во многу мал број.

Значаен дел од клеточниот состав на пулпата претставуваат, **недиференцираните мезенхимални клетки**. Тие се сместени во зона богата со клетки и во пулпината строма околу крвните садови, го претставуваат резервоарот на клетки од кои при повреда на пулпата во зависност од стимулот, може да се диференцираат во фибробласти и, веројатно, одонтобласти.⁵⁹

Во инфламирања и неинфламирања пулпа се среќаваат **маст-клетки**. Тие најчесто се локализирани околу крвните садови. Во својата цитоплазма содржат гранули што се богати со хепарин (антикоагулант) и хистамин (инфламаторен медијатор).^{31,59}

Влакната на пулпата се претставени преку два типа на структурни протеини: колаген и еластин.

Колагенот тип *I* доминира во дентинот, додека тип *I* и тип *III* се најдени во пулпата. Колагенот тип *I* го синтетизираат и секретираат одонтобластите кои се инкорпорирани во дентинскиот матрикс, додека типот *I* и *III* го синтетизираат фибробластите од пулпата. Исто така, во мали количини, може да се сретне колагенот тип *IV* кој е составен дел на базалната мембрана околу крвните садови,^{13,59} и тип *V* кој е дел од ѕидот на крвните садови.

Пропорцијата на типовите колагени влакна е константна за време на формирањето на пулпата и нејзината зрелост, но вкупната содржина на колаген станува многу проминентна со стареењето, поради фактот што кај постарите пулпи тој се организира повеќе во снопови отколку во поедини влакна. Нормално, апикалниот дел на пулпата содржи повеќе колаген отколку коронарниот.

Еластинските влакна се наоѓаат само во ѕидовите на артериолите и за разлика од колагенот тие не се дел од интерцелуларниот матрикс.

Основната супстанција го претставува матриксот во кој се вклопени сврзно-ткивните клетки и влакна. Таа се состои од *пирополисахариди* (хијалуронска киселина, хепаран сулфат, хондроитин сулфат и дерматан сулфат), *гликопротеини* (фибронектин, ламинин и тенасцин) и *вода*. Таа е милје од сол и гел која ги поддржува клетките и дејствува како медиум за транспорт на хранливи материи и метаболити.^{13,59}

Промените во составот на основната супстанција предизвикани со стареење или болест (одредени инфламаторни состојби), влијаат на нормалната активност на клетките и доведуваат до нерегуларности во клеточната функција и депонирање на минерали.

Пулпата е **сензорен орган** што ги пренесува информациите од неговите сензорни рецептори во пулпата до централниот нервен систем. Сите аферентни импулси од пулпата резултираат со сензација на болка.

Покрај соматските нервни влакна, во пулпата постојат и автономни нервни влакна, симпатички, што се одговорни за регулирање на микроциркулацијата во пулпата.^{3,59}

Inoue и сор.(1992) докажале дека симпатичките нервни влакна се распоредени околу артериолите во пулпата и нивната стимулација доведува до намалување на протокот на крв. Овие влакна, исто така се најдени независно од крвните садови, блиску до регијата на одонтобластите. И адренергичните и холинергичните влакна се најдени во близина на одонтобластите. Се мисли дека автономните нервни влакна се вклучени, на некој начин, во регулирањето на дентиногенезата.

Сензорните нерви кои ја инервираат пулпата се мешани нерви. Тие содржат миелинизирани ($A-\delta$ и $A-\beta$ влакна) и немиелинизирани (C) аксони.

Миелинизираните сензорни нерви одат коронарно и даваат гранки што продолжуваат кон одонтобласниот слој. Во тој регион тие ја губат миелинската обвивка и завршуваат како мали немиелинизирани гранчиња. Најинтензивното разгранување се случува во коронарниот регион (особено во пределот на рогот на пулпата), каде тие формираат сплетови (синцициуми) од нерви во субодонтобласниот регион кој е наречен *Рашков плексус*. Целосното формирање на овој плексус се одвива дури откако ќе се заврши растот на коренот.

Некои од нервните влакна поминуваат помеѓу одонтобластите и се враќаат повторно во плексусот. Други пак, поминуваат покрај одонтобластите и влегуваат во тубулите заедно со одонтобласното продолжение. Тие не формираат синапса со продолжението, но остануваат во негова непосредна близина во одреден дел од неговата должина.

Долго време е дискутирано, дали нервните влакна се простираат до емајл-дентин-цементната граница. Најновите сознанија укажуваат дека нервните аксони не се простираат подалеку од 0.2 мм во коронарниот или радикуларниот дентин.⁶⁹

Кај повеќето истражувачи, во последно време, најприфатена е "хидродинамичната теорија", според која нервниот импулс предизвикан од надворешни стимуланти се пренесува преку движење на течноста во дентинските тубули. Движењето на течноста во дентинските тубули, се претпоставува дека ги активира слободните нервни завршоци што се наоѓаат околу одонтобластите, во внатрешните слоеви на дентинот.¹¹⁷ Типот и релативниот број на нервите зависи од степенот на формирањето на забот.

Зрелата пулпа има екстензивна и единствена **васкуларизација**, која ја рефлектира нејзината специфична местоположба. Пулпата се снабдува со крв преку артериоли, со дијаметар од 100 μm или помалку,

кои минуваат низ апикалниот отвор или отвори заедно со нервните снопови. Помалите крвни садови може да влезат во пулпата преку латералните и акцесорните канали. Артериолите минуваат низ централниот дел на радикуларната пулпа, ширејќи гранки латерално кон одонтобласниот слој под кој тие се разгрануваат формирајќи капиларен плексус. Капиларниот крвоток во коронарниот дел од пулпата е скоро двојно поголем од тој во радикуларниот.¹⁶⁴ Крвното снабдување во пределот на роговите на пулпата е поголемо во однос на другите делови. Кај млади заби капиларите навлегуваат и во одонтобласниот слој, со што тие обезбедуваат адекватно снабдување со хранливи продукти на метаболно активните одонтобласти. Субодонтобласните капилари се опкружени со базална мембрана во чии сидови може да се видат фенестрации (пори), кои служат за транспорт на течности и метаболити од капиларите до соседните одонтобласти. Крвта од капиларниот плексус оди во посткапиларните венули а потоа прогресивно во се поголеми венули, кои го напуштаат забот преку неговиот апекс. Тие имаат тенок сид кој овозможува движење на течноста во и надвор од крвниот сад. Мускулниот сид е тенок и испрекинат. Венулите стануваат се поголеми одејќи кон централниот регион на пулпата. Најголемите венули имаат дијаметар кој може да достигне максимално до 200 μm , што покажува дека тие се значително поголеми од артериолите во пулпата.

Посебно важно за самата пулпа е присуството на екстензивен шант систем составен од артерио-венски и вено-венски анастомози коишто стануваат активни при иритација и репарација на пулпата.⁵⁹ Артерио-венските анастомози се присутни како во коронарниот, така и во радикуларниот дел на пулпата. Тие овозможуваат директна комуникација помеѓу артериолите и венулите, на тој начин се прескокнуваат капиларните корита. Со тоа се овозможува отстранување на крвта од местото на повредата со што се спречува оштетувањето на микроциркулацијата, кое може да доведе до тромбоза и хеморагија.

Протокот на крвта во пулпата, во најголем дел, е под контрола на адренергичниот симпатичен систем.^{56,156} Меѓутоа, недостасуваат докази за парасимпатичката регулација на крвоснабдувањето во пулпата.²²

Поради својата местоположба пулпиното ткиво има ограничени можности за експанзија, така што при вазодилатација и зголемена васкуларна пермеабилност, предизвикани за време на инфламаторната реакција, се зголемува хидростатскиот притисок во истата. Секое нагло зголемување на интрапулпиниот притисок ќе биде дистрибуирано подеднакво во зоната на зголемениот притисок, вклучувајќи ги и крвните садови. Ако притисокот во ткивото порасне до степен кој е еднаков на интраваскуларниот притисок, венулите кои имаат тенки сидови ќе бидат компримирани и притоа ќе се зголеми васкуларниот отпор, а ќе се

намали протокот на крвта во пулпата. Ова доведува до намалено снабдување со хранливи материи и кислород, поради што настанува оштетување на пулпата.⁵⁷

Лимфната дренажа во пулпата се врши преку лимфни садови. Тие почнуваат како мали садови со тенки ѕидови во коронарниот регион на пулпата, потоа поминуваат низ средината и апикалниот регион за да излезат како еден или два поголеми садови низ апикалниот форамен. Лимфниот систем помага во резолуцијата на воспалението со отстранување на инфламаторниот ексудат, трансудат и целуларниот дебрис.^{14,163}

2.2. КАРИЕС

Во секојдневната практика пациентите и здравствените работници, обично за кариесот зборуваат како за дефект во забната супстанција. Меѓутоа, кариозниот дефект претставува знак или симптом на заболување и како таков е доцна рефлексивна на самата болест.

Заболувањето "кариес на забите" е динамичен процес кој се одвива во микробиолошките депоа (денталниот плак) на забните површини што доведува до пореметување на еквилибриумот помеѓу забната супстанција и околната течност од плакот, така што со тек на време крајниот резултат е загуба на минерали од забната површина.

Клинички оваа загуба може да биде видлива од едвај променетата транспарентност на емајлот, па се до големи кавитети кои може да се простираат дури до пулпата.¹³¹

2.2.1. Микробиологија на кариесот

Денталниот кариес е мултифакториелно прогресивно деструктивно заболување на забите, во чие настанување, учествуваат три фактори: *Домаќин* (плунка и заби), *микрoфлора* и *суйсџраи* (исхрана). Времето (како четврти фактор) би требало исто така да се земе во предвид. Присуството на денталниот плак на површината на забите е една од основните причини за настанување на забниот кариес. Протеините од плунката се адсорбираат на површината од емајлот со селективна адсорпција, со што формираат протеински слој врз забот, кој се нарекува "џеликула".

Денталниот плак претставува агрегација на огромен број на различни микроорганизми на забната површина, а тоа е како резултат на лоша орална хигиена. Првите кои ја населуваат се грам позитивни коки и стапчиња, а *Streptococcus sanguis* е, веројатно, најзастапениот микроорганизам. Бактериите формираат микроколони, кои се распоредени перпендикуларно на забната површина. Тогаш се овозможуваат услови за анаеробните микроорганизми како што се *Veillonellae*, *Actinomyces* и *Fusobacteriae*.

Студиите што се занимавале со испитување на микрофлората на почетните кариозни лезии, потврдиле дека постои колонизација на забните површини со *S. mutans*.²⁵ Duchin и Van Houte (1978) измериле повисоки концентрации на *S. mutans* во заби со почетен кариес отколку во околните здрави заби. Оваа студија покажала дека *S. mutans* е повеќе поврзан со иницирањето на кариесот отколку *Lactobacillus*. Лонгитудиналните анализи од микробиологијата на плакот за време на формирањето на апроксималните лезии кај деца, укажале на присуството и на двата микроорганизми, но бројот на бактериите од родот на *Lactobacillus* подоцна се зголемил отколку на *S. mutans*.

Неколку различни типови на микроорганизми се сметаат за потенцијално кариогени. Различни орални микроорганизми покажуваат селективност кон одредени забни површини кои ги напаѓаат. Нивната дистрибуција, може да се промени со напредувањето на кариозната лезија. Најзастапен микроорганизам во плакот е од родот стрептококи (*Streptococcus mutans*)¹⁵⁸, како специес кој има најважна улога во предизвикувањето на кариесот.

Неколку други видови на стрептококи се присутни во оралната шуплина, но изгледа дека не играат некоја голема улога во формирањето на кариесот.

Друг микроорганизам кој има важна улога во формирањето на кариесот е *Lactobacillus* кој се среќава повеќе во длабоките кариозни лезии. Тие заземаат мала фракција од флората во денталниот плак и нивната улога не е толку битна за почетокот на кариозната лезија, туку во неговото понатамошно ширење.

Actinomyces е микроорганизам кој е вклучен во предизвикувањето на кариозни лезии во пределот на вратот на забите.¹⁷⁰

Од погоре кажаното можеме да видиме дека во кариозната лезија се вклучени повеќе микроорганизми, но најзастапениот тип на микроорганизам често се менува со прогресијата на кариозната лезија.¹⁵³

Кариогените микроорганизми (*S. mutans* и другите типови на стрептококи) за да предизвикаат дентален кариес, треба да бидат во можност да изведат четири процеси:¹⁹

1. да адхерираат на забната површина и да се акумулираат во доволен број за да предизвикаат заболување,⁶³
2. микроорганизмиите треба да произведуваат нерасиворливи во вода ѓолимерни ѓлукани ииџо во контакт со одредени ѓроџеини кои врзуваат ѓлукан, овозможуваат иницијално ѓоврзување и ѓо катализираат формирањето на био-филмовите на забите боѓајќи со ѓолисахариди,
3. коѓа е формиран денџалниот ѓлак, микроорганизмиите во него мора да ѓродуцираат киселини кои ќе доведат до деминерализација на емајлот. *S. mutans*

поседува транспортен систем за шеќериите и способност да произведува интра и екстрацелуларни полисахариди,

4. бактериите мора да бидат толерантни на киселини. Во оваа смисла треба да се истакне *S. mutans* кој може да расте и да ја извршува гликолизата на екстремни pH вредности во усната празнина.

Сите микроорганизми во усната средина имаат метаболна активност во која саливарните гликопротеини се есенцијален нутриент, па поради тоа кога во исхраната се повеќе застапени ферментабилните јагленохидрати, метаболната активност на микроорганизмите е зголемена.

Факторите кои се вклучени во патогенезата се силно зависни од условите на локалната средина. Различната експресија на нивната вирулентност зазема централно место во способноста на микроорганизмите да се акумулираат во доволно голем број во патогениот дентален плак.

Откако кариозниот процес ќе стигне до емај-дентинската граница тој продолжува да се шири во дентинот. Кога кариозната лезија во дентинот се проучува хистолошки, може да се види дека дентинот е покриен со некротичен материјал, а микробиолошките испитувања покажуваат дека оваа регија е колонизирана со грам позитивни ацидогени и ацидурични бактерии. pH на кариозниот дентин може да биде низок и бактериите од дентинот да бидат повеќе ацидурични отколку оние во супрагингивалниот плак.

Влијанието од локалната средина во составот на микрофлората е исто така евидентно во напредувачкиот фронт на лезијата, каде доминираат грам позитивни стапчиња како *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*,³⁹ додека помалку се застапени стрептококи (вклучувајќи го и *S. mutans*) и грам негативни бактерии. Локалната средина, во кариозната лезија доведува до променета бактериска флора, која е различна од таа во супрагингивалниот плак. Причина за ваквата селекција може да биде достапноста на протеински супстрат и низок pH. Кариозниот дентин содржи органски киселини, најмногу лактат, ацетат, пропионат и бутират. Покрај тоа што се ацидогени, некои од бактериите можат да ги разградуваат протеините и пептидите.

Разградбата на минералните фракции на дентинот ги експонира колагените влакна на деградација на различни специфични и неспецифични протеази. Органските киселини влијаат и на деградацијата на органскиот матрикс, поради тоа што вршат денатурација на колагенот. Понатаму, тој станува достапен и за разградба на бактерии кои не поседуваат колагенази. Како последица на тоа, локалните услови во кариозниот дентин овозможуваат развој не

само на ацидурични бактерии туку и на оние кои можат да деградираат и метаболизираат протеини и пептиди.

Повеќето заболувања на пулпата се директно или индиректно поврзани со присуството на микроорганизмите. Тие можат на неколку начини да навлезат во пулпата. Ако недостасува емајлот или цементот тие навлегуваат директно преку експонираните дентински тубули.²⁸

Познавањето на бактериите кои се вклучени во патологијата на ендодонциумот е важно за разбирање на процесот на заболување, како и начинот за негово лекување. Пулпината инфекција најчесто е мултибактериелна.⁷⁹ Во денешно време бројни истражувачи се обидуваат да ја дефинираат улогата на специфични микроорганизми или групи на бактерии во патогенезата на пулпиното заболување. Со употреба на микроскопирање во темно поле утврдено е присуство на коки, стапчиња, филаменти, спирохети и подвижни микроорганизми во каналите на коренот од забот.

Поранешните студии известуваат дека во лезијата доминираат факултативните во однос на облигатните анаероби. Родот на *Streptococcus* (*alpha* и *gamma*), грам негативните коки⁸⁴ и *Lactobacillite* се најчесто присутни, со различен број на анаероби, кои се најчесто помалку од 50% од вкупниот број на изолираните микроорганизми.¹⁰¹ Правени се бројни студии во кои е испитувана реакцијата на пулпата на одредени типови на *Streptococcus* и *Lactobacillus*. При тоа е утврдено дека *Lactobacillite*¹⁰³ се покажале како некариогени и во исто време не предизвикувале инфламаторна реакција на пулпата кај гнотобиотични животни. Испитувањата во кои беа вклучени стрептококите покажале дека *Streptococcus mutans* групата има слаб патоген ефект на пулпата кога е аплицирана изолирано. Од изнесените податоци може да се види дека некои кариогени микроорганизми имаат ограничена можност да предизвикаат воспаление на пулпата.^{102,104,105,106, 107,108,171}

Со употреба на посовремени техники изолиран е голем спектар на различни бактерии. Голем број на студии известуваат дека најголем број на микроорганизми кои се пронајдени во пулпата, припаѓаат на нормалната микрофлора на усната празнина и многу ретко е изолирана бактерија која би можела да потекнува од друг дел на телото. Значи, мешана бактериска флора била изолирана во голем број на студии. Оваа мешавина обично содржи од 5 до 8 видови бактерии. Најчесто се застапени неколку видови на *Bacteroides*.¹¹³ Темно пигментираниот род на *Bacteroides* се здобил со значајна предност во истражувањето на патогенезата на ендодонтските инфекции. Тој претставува хетерогена група на микроорганизми, која е поделена на осум одделни видови, и тоа *B. asaccharoliticus*, *B. corporis*, *B. denticola*, *B. endodontalis*, *B. gingivalis*, *B. intermedius*, *B. melaninigenicus* и *B. loeschei*. Овие микроорганизми се

способни да продуцираат апсцеси кои се болни и бргу се шират, додека *B. intermedius* и *B. endodontalis* предизвикуваат локализирани апсцеси.

Бројните студии кои се публикувани укажуваат на мултибактериелната етиологија на ендодонтските инфекции. *Dabelin* и *сop.*(1991)го изолирале *Propionibacterium acnes* во коренските канали. *Actinomyces israelii* исто така е изолиран во еден случај на перзистентна канална инфекција.³²

Инфламацијата на пулпата се претпоставува дека почесто е резултат на пенетрацијата на бактериските продукти отколку вистинска инфекција со микроорганизми. Општо е прифатено дека бактериите не ја инвадираат денталната пулпа ако постои клинички здрав дентин помеѓу неа и кариозната лезија.

Меѓутоа, микроскопските студии на *Reevs* и *сop.*(1966) и *Mackay* (1976) покажале дека кариозната лезија предизвикува бактериска пенетрација низ дентинските тубули. Во поново време, експерименталните испитувања изведувани во анаеробни услови, овозможија да се покаже раната бактериска инвазија на неекспонирана дентална пулпа, и да се изолираат и идентифицираат бактериите.

Hoshino и *сop.*(1992) се на мислење, дека анаеробните бактерии од длабоките слоеви на кариозниот дентин вршат инвазија на неекспонирана дентална пулпа. Предоминантни бактерии биле облигатните анаероби: *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella* и *Streptococcus*. Составот на бактериите одговара на изолираните бактерии од длабоките слоеви на кариозната лезија во дентинот, што сугерира дека тие поминале низ некои индивидуални дентински тубули и навлегле во пулпата.

До вакви слични резултати дошле и *Toda* и *сop.*(1997) кои испитувале неекспонирана витална пулпа, веднаш по пулпектомија, при што кај виталните пулпи со реверзибилно воспаление биле изолирани факултативните анаероби *Streptococcus* и *Lactobacillus*, додека кај пулпите со ирреверзибилно воспаление покрај веќе спомнатите факултативни анаероби *Streptococcus* и *Lactobacillus* биле изолирани и *Prevotella* и *Eubacterium*.

2.2.2. Клинички и патолошки карактеристики на забниот кариес

Главните карактеристики на денталниот кариес се:

1. хронично заболување со бавен тек,
2. заболувањето не може само од себе да престигне, ако не се спроведе адекватен третман, при што кариесот прогресира додека целосно не го деструира забот.

Во овој дел подетално ќе бидат разгледани некои од можните интраорални механизми што се одговорни за еволуцијата на денџалниот кариес.

Здравиот емајл се состои од густо пакувани хидроксилпатитни кристали така што тој личи на стакло и е транслуцентен. И покрај тоа што кристалите се цврсто поврзани, на макроскопско ниво, секој кристал е одвоен од соседниот со тенки интеркристални простори. Овие простори не се празни туку се полни со вода и органски материјал. Тие заедно формираат фина мрежа на дифузиони патишта кои често се нарекуваат микропори или поедноставно *џори во емајлот*. Кога емајлот е изложен на дејство на киселини произведени во плакот, минералите се отстрануваат од кристалите. Дури и мала загуба на минерали од периферијата на кристалите ја намалува големината на кристалот со што тој се “собира”. Ова резултира со зголемување на интеркристалните простори што може да се види како зголемување на ткивната порозност, па деминерализираниот емајл станува многу попорозен. Типично за почетните кариозни лезии е наодот на зголемена порозност на подповршинскиот слој како резултат на зголемените интеркристални простори проследени со добро минерализиран или релативно непроменет површински слој.¹⁵²

По 14 дена дејство на денталниот плак доаѓа до понатамошно зголемување на подповршинската деминерализација и до комплетно растварање на површниот слој каде се јавуваат поголеми ирегуларности како фисури и локални јамички. Се претпоставува дека причината за отпорноста на површниот слој на емајлот е резултат на постоењето на таканаречените инхибитори присутни во плакот. Тие делуваат двојно, го спречуваат спонтаното и селективно преципитирање на калциум фосфатот (или зголемувањето на кристалите од овие соли) директно на емајловата површина и исто така се стремат да ја инхибираат деминерализацијата. Овие инхибитори се макромолекули и поради тоа не може да навлезат во подлабоките слоеви на емајлот, па затоа нивната стабилизирачка улога е можна само на површината на забот.

Со зголемувањето на ткивната порозност на емајлот тој станува помалку транспарентен, а тоа клинички може да се забележи како беликаво (кредаво) пребојување.

После отстранувањето на денталниот плак настанува арест на кариозната лезија. Таа има изглед на сјајна и цврста површина и е резултат на абразија или полирање на делумно растворената површина на активната лезија. Механичкото отстранување на најповршните делумно растворени кристали резултира со експонирање на подлабоко поставените меѓусебно цврсто поврзани кристали што го дава клиничкото чувство на повторно обновената цврстина на површината.

Ширењето на кариесот во *дентинот* ги зафаќа и одонтобластите кои се интегрален дел на пулподентинскиот орган. Поради овие причини дентинот се смета за витално ткиво, во кое дејствувањето на надворешните инсулти доведува до специфични одбранбени реакции. Мора да се истакне дека емајлот како солидно ткиво сепак е микропорозен и овозможува пренесување на дразбите од оралната средина до пулподентинскиот орган. Најчеста одбранбена реакција на пулподентинскиот орган која може да се види со светлосен микроскоп е *тубуларната склероза* (депонирање на минерали внатре во дентинските тубули). Оваа реакција на дентинот одговара на најпорозниот дел на емалјовата лезија. Иницијалната тубуларна склероза се гледа пред да стигне емалјовата лезија до емајл-дентинската граница. Кога кариозната лезија ќе се прошири до емајл-дентинската граница првите знаци на деминерализација на дентинот се гледаат долж границата како кафеникава дисколорација. Таа не се јавува како резултат на латералното ширење на стимулите долж емајл-дентинската граница туку е создадена од стимулусите што се пренесуваат долж соседните помалку зафатени делови на емајлот.¹⁵⁴ Промените на дентинот не претставуваат континуирана реакција на пулподентинскиот орган. Кога ќе престане дејствувањето на киселините на емајлот поради отстранување на кариогените микробиолошки фактори, тогаш престанува и понатамошната деминерализација и се спречува прогресијата на лезијата. Вградувањето на минералите во емајлот и дентинот од плунката е многу лимитирано, па поради тоа деминерализираниот емајл и дентин се како “*белез, лузна*“ во ткивото. За да се оневозможи понатамошната деструкција треба да се примени конзервативен третман.^{86,153}

Со отстранување на минералите емајлот станува порозен, но преостанатите минерали се уште ја одржуваат структурата на емајлот. Бактериите може да се најдат во порозниот емајл, а некои од нив може да пенетрираат долж органските компоненти на емајлот како што се ламелите. Откако бактериите ќе стигнат до емајл-дентинската граница тие навлегуваат во дентинските тубули, каде ги екскретираат метаболните крајни продукти, кои влијаат на деструкцијата. После експонирањето на дентинот со бактерии најповршниот дел на кавитетот се разградува како резултат на делувањето на органските киселини (млечна киселина)⁵⁸ и протеолитичните ензими. Овие киселини исто така играат улога во разградувањето на органскиот матрикс⁶⁶ како на емајлот така и на дентинот. Поради фактот што мал број на орални бактерии го поседуваат ензимот колагеназа, колагеназниот матрикс на дентинот може да биде разграден од бактериските протеази ако колагенот е претходно денатуриран со киселина. Оваа зона е наречена

зона на деструкција. Под неа, тубулите се ивадираат од страна на бактериите.

Ако лезијата се шири многу брзо, може да се видат таканаречените “*dead tracks*” во дентинот, што значи, дека одонтобласните продолжоци се деструирани многу брзо без да имаат можност да создадат дентин кој ќе ги облитерира дентинските тубули.^{66,165}

Дентинот и пулпата треба да се сметаат како еден биолошки континуитет. Поради фактот што комуникацијата на кариозната лезија со пулпата се остварува преку дентинот, пропустливоста на дентинот е клучен фактор во детерминирањето на одговорот на пулпата. Кај витални заби, пропустливоста на дентинските тубули е одредена со присуството на одонтобласните продолжоци, колагените фибрили и дентинскиот флуид. Нивна функција е да ги исполнат дентинските тубули и со тоа ги прават порезистентни кон бактериската инвазија.⁸²

Пропустливоста на дентинот расте со зголемувањето на длабочината на кавитетот, затоа што дијаметарот и густината на дентинските тубули расте со продлабочувањето на кавитетот. Поради тоа колку е подлабок кавитетот толку е поголема површината на дентинските тубули преку која можат потенцијално токсичните супстанции да пенетрираат и дифундираат кон пулпата. Должината на дентинските тубули под кавитетот исто така е важна. Колку подолго треба да дифундираат супстанциите толку е поголема можноста да бидат разредени и пуферирани од дентинската течност. Ако преостане дентин во дебелина од *2mm*, се смета дека е доволен за да ја заштити пулпата од повеќето иритирачки фактори.

Дентинските каналчиња кај младите трајни заби се пошироки и само делумно исполнети со протоплазматските продолжетоци, а на периферијата со дентински флуид. Според тоа иритирачките фактори под одредени услови може да продрат во пулпата без претходно да го деструираат дентинот.¹⁶⁸

2.2.3. Одговор на пулпното ткиво од бактериска инфекција

Пулпата реагира на кариес уште многу порано пред да настане бактериска пенетрација во пулпината комора.^{15,17} Во зависност од јачината и траењето на инсултот, како и од капацитетот на домаќинот да реагира, одговорот на пулпата се движи од благ, краткотраен инфламаторен одговор (*реверзибилно воспаление на пулпата*) до јак инфламаторен одговор што води до *иреверзибилно воспаление на пулпата* и на крај до *тотална некроза*. Овие промени најчесто се асимптоматски (без болка) и настануваат без знаење на пациентот и клиничарот.^{6,126,127}

Солубилните иританси и инфламаторни стимули кои дифундираат од кариозната лезија низ дентинот се сметаат за важни во етиологијата на заболувањето на пулпата. Бактериите ослободуваат бројни ткивно-иритирачки супстанции, како што се бактериски ензими, метаболни продукти и други екстрацелуларни супстанции.^{9,65,109,162,169} После лизата и дезинтеграцијата на бактериските клетки, се ослободуваат и бројни компоненти од бактериска клеточна структура. Нивниот патогенетски ефект е проучуван во бројни *in vitro* и *in vivo* системи, некои имаат директен токсичен ефект на ткивните клетки, додека другите дејствуваат како иритатори со предизвикување на инфламација и имунолошки реакции.^{5,165}

Во хистолошка студија направена врз мајмуни, *Bergholtz* и *Lindhe* (1975) нашле дека топичната апликација на екстракт од хуман дентален плак на експониран дентин предизвикува васкуларни реакции и миграција на леукоцити во пулпиното ткиво на влезот на експонираните дентински тубули. Тие заклучиле дека нормалниот дентин со експонирани дентински тубули не може да ја заштити пулпата од штетните агенси ослободени од денталниот плак и кариозниот дентин.

Во друга студија *Bergholtz* (1977) употребил екстрацелуларни и интрацелуларни компоненти од бактерии во денталниот плак и го анализираше нивниот капацитет да предизвикаат инфламаторни реакции во денталната пулпа кај мајмуни. Резултатите од испитувањето го потврдиле фактот дека продуктите од бактериите аплицирани на експониран дентин може да предизвикаат инфламаторни реакции во денталната пулпа.

Истиот автор¹⁰ во следното свое испитување употребил клеточен материјал од три различни бактерии изолирани од денталниот плак (*Actinomyces viscosus*, *Streptococcus mitis* и *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) и го испитал нивниот капацитет да предизвикаат миграција на леукоцити во пулпа од мајмуни. Хистолошките испитувања на примероците од пулпиното ткиво покажале дека материјалите од двата бактериски специеса (*A. viscosus* и *Act. actinomycetemcomitans*) постојано предизвикувале инфилтрација со полиморфонуклеарни леукоцити, додека *S. mitis* се покажал помалку потентен, па во половината од испитаните примероци (11/22) не предизвикал пулпина реакција.

Други автори⁸⁷ во *in vitro* студија ја испитувале способноста на бактерискиот ендотоксин да дифундира низ дентинот при што нашле дека истиот е способен да дифундира во пулпата низ 0,5 мм дебел дентин. Овие студии укажуваат дека метаболните продукти добиени од дентален плак или кариогени бактерии, вклучувајќи ги и бактериските ензими и структурните компоненти не само што предизвикуваат неспецифичен инфламаторен одговор туку дејствуваат и како анигени што предизвикуваат специфичен имунолошки одговор во пулпата.

Според досегашните сознанија се смета дека родот *Bacteroides* игра значајна улога во патогенезата и клиничните знаци (симптоми) на пулпното заболување. Протеиназите што се ослободуваат од овие микроорганизми, можат да разградат неколку важни одбранбени протеини како што се имуноглобулините и компонентите на комплементот.¹¹³

Други студии⁵ укажуваат дека денталната пулпа под длабоките кариозни лезии, во поедини случаи, не покажува патолошки промени. Ова може да се должи на следниве причини:

1. вируленцијата или количината на микроорганизмите може да биде мала или концентрацијата на антигенои да биде недоволна за да предизвика инфламација на пулпата,
2. пулпата може да има добар одбранбен капацитет,
3. денгинскиите тубули може да имаат мала permeабилност која не дозволува продор на микробните фактори во пулпата,
4. кариозната лезија може да биде далеку од пулпата така што бактериите или нивните производи одејќи кон пулпата постепено се разредуваат од флуидот во денгинскиите тубули.

Стевановиќ¹⁴³ вршела испитувања на реактивниот полиморфизам на пулподентинскиот орган при некомплицирани кариозни лезии кај трајни заби со истовремена проценка на нивната реверзибилност. Испитувањата се направени со употреба на комплетни клинички дијагностички тестови, светлосно микроскопска анализа на полутенки пресеци и електронско микроскопска анализа на ултратенки пресеци (TEM), како и употреба на Scanning електронски микроскоп (SEM). Во зависност од длабочината на кариозната лезија, авторот регистрирал различни степени на реакција на пулподентинскиот орган. Најдени се структурно-функционални нарушувања во одонтобласниот слој, Weill-та зона и клеточната зона. Кај *caries superficialis* најдена е само лесна вознемиреност на одонтобластите и стеснување на Weill-та зона, додека кај *caries media* најдена е зголемена секреторна активност на одонтобластите и поширок појас на новоформиран предентин. Кај длабокиот кариес присутни се различни типови реакции на пулпата, од одбрамбено репараторни реакции па се до дистрофично-дегенеративни промени од I и II степен.

Оцаклиевска⁹⁸ вршела проценка на реактивната и реверзибилната способност на забната пулпа при *caries profunda complicata* и се направени клинички, хистолошки и биохемиски испитувања, со цел да се добијат информации за цитоморфолошките, функционалните и биохемиските промени во пулподентинскиот орган. Промените, без разлика на

степенот на оштетувањето на пулата биле ограничени на делот под кариозната лезија при што тие ги зафаќаат сите зони на пулпиниот орган. Кај 43% од испитаните примероци авторот нашол присуство на хроничен воспалителен инфилтрат како и зголемена концентрација на *IgG*, *IgA* и *IgM*. Овие наоди, заедно со наодите за зголемена секреторна активност на одонтобластите и замената на оштетените одонтобласти со клетки кои мигрираат од целуларната зона, зборуваат во прилог на реверзибилноста на промените во пулата.

2.3. НАЧИНИ НА ИНФЕКЦИЈА НА ПУЛАТА

Најчести начини на контаминација на пулата се:

1. ексџонирани денџински тубули

Големината и бројот на тубулите во дентинот им овозможува на микроорганизмите да навлезат, да се размножуваат и да ги инвадираат. Присуството на бактериите, нивните продукти и други иритатори во дентинските тубули обично предизвикуваат воспалителен одговор во пулпиното ткиво.⁷⁴ До воспаление може да дојде и при почетен кариес кога преку дентинските тубули се транспортираат иритатори во пулата или кога тубулите содржат односно пренесуваат микроорганизми што се присутни под реставративните дентални материјали.^{55,75}

Меѓутоа, одредени супстанции може да се движат во спротивна насока, од пулата кон кариозната лезија. *Okamura*^{91,92} во испитувањата на кариозен дентин укажал на присуство од протеини, имуноглобулини и комплемент во кариозен дентин кои потекнувале од плазмата и биле способни да ја инхибираат бактериската активност во лезијата.

2. директна ексџозиција на пулата

Како резултат на трауматски повреди или деструкција на забот може да дојде до контаминација на пулпиното ткиво.

3. латентен и акутен форамен на забот

4. хематојени инфекции

Привлекувањето на микроорганизмите од крвта при бактериемија од страна на инфламираана или некротична пула се нарекува *анакореза*.⁵⁵

2.4. ОДБРАНБЕНИ РЕАКЦИИ НА ПУЛАТА

Основни реакции кои се стремат да ја заштитат пулата од кариес се:

2.4.1. Намалување на пермеабилитетот на дентинот

Со намалувањето на неговиот пермеабилитет, луменот на повеќето дентински тубули кои се наоѓаат помеѓу базата на лезијата и

денталната пулпа, се оклудираат со минерални депозити.⁷⁸ Овој процес се нарекува дентинска склероза. Тубуларната склероза може да биде резултат на иницијална минерализација на перитубуларниот простор, што е проследено со калцификација на одонтобласниот продолжок или пак е резултат на иницијална интрацитоплазматска калцификација, што е проследено со периодонтобласна минерализација.^{81,140}

2.4.2. Формирање на нов дентин (репараторен дентин)

Способноста на пулпата да создава репараторен дентин под кариозната лезија е друг механизам за лимитирање на дифузијата на токсичните супстанции од дентинот. Бидејќи во поедини дентински тубули настанува изумирање, односно повлекување на одонтобласните продолжоци тие остануваат празни и се многу пермеабилни, здравата пулпа реагира со депонирање слој на репараторен дентин со што настанува нивно “зајечайвање”.^{58,64,165}

2.4.3. Воспалителни реакции на пулпното ткиво.

2.4.3.1. Општи карактеристики на воспалителната реакција

Воспалителната реакција се одвива во четири фази:

1. зголемена васкуларна пермеабилност,
2. миграција на неутрофили,
3. миграција на моноклеарни клетки,
4. клеточна пролиферација.

Зголемената васкуларна пермеабилност примарно ја афицира микроциркулацијата (капилари, артериоли и венули). Крвниот тек е забрзан со локализирана дилатација на капиларите и венулите како резултат на ослободените медијатори од повреденото ткиво (на пр. *хистаминоид*). Тогаш започнува трансудацијата која претставува преминување на серум или други телесни течности низ базалните мембрани. Трансудатот се карактеризира со сиромашен протеински состав и малку клетки, за разлика од ексудатот кој е богат со инфламаторни клетки. Трансудацијата се овозможува под дејство на хемиски медијатори, како што се хистаминот и кинините, кои доведуваат до тоа, да ендотелните клетки на мазните мускули се раздвојуваат помеѓу себе создавајќи “пукнатини” низ кои течноста и полиморфонуклеарните леукоцити (ПМН) излегуваат низ базалната мембрана во ткивото (претежно од венската мрежа локализирана во центарот на пулпата).⁶¹ Крвниот проток во дилатираните капилари и венули може да се успори и да предизвика комплетна стаза како

резултат на хемоконцентрацијата предизвикана од прекумерната загуба на течност. Стазата е комплетно реверзибилна, кога крвниот проток повторно ќе се обнови. Кај младите трајни заби стазата е уште појако изразена поради богатата крвна мрежа. Притисокот кој настанува во пулпата е поголем, последиците во смисла на болка се поинтензивни, но и релаксацијата на притисокот преку широко отворениот апекс е поизразена.

По почетното оштетување, ендотелните клетки експресираат површни рецептори што ги прават лепливи, така што циркулирачките ПМН почнуваат да адхерираат на ендотелот. На почеток, бројот на ПМН е мал, но како што процесот продолжува ендотелната површина станува комплетно покриена со ПМН.

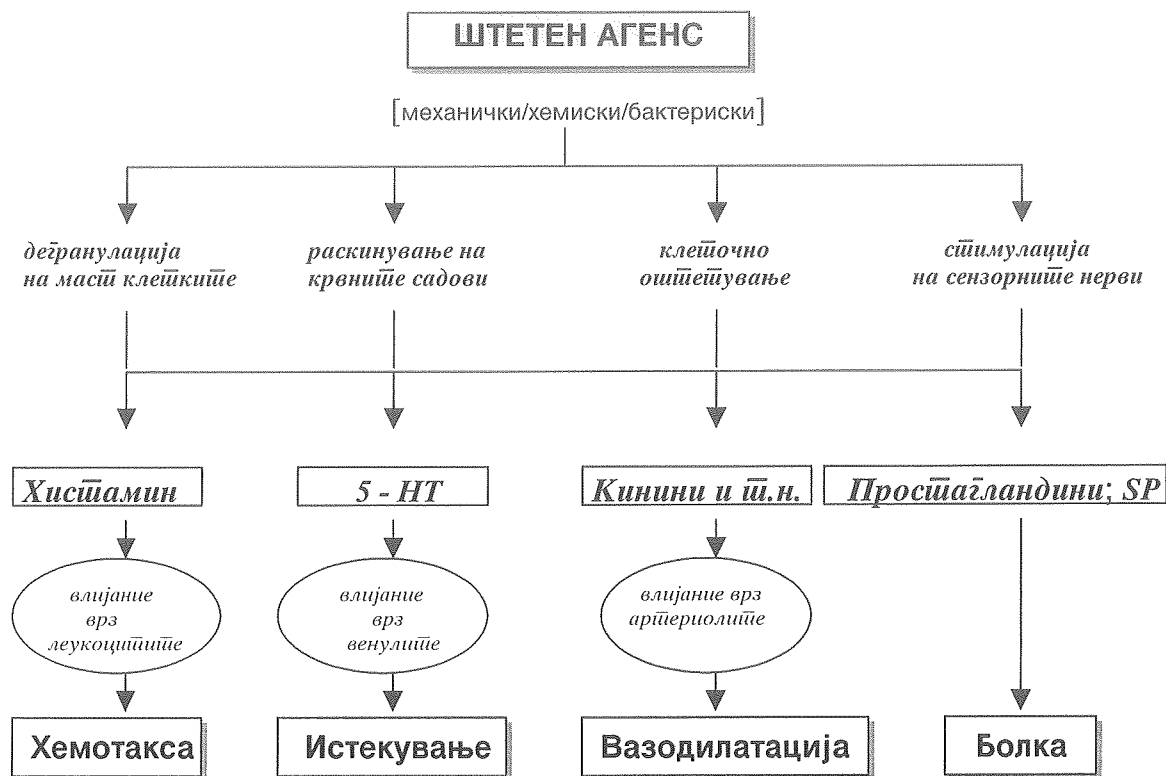
После врзувањето, клетките амебоидно се движат и активно *мигрираат* низ сидовите на крвните садови во зоната на инфламација (со помош на дијаједза). Миграцијата зависи од хемотактичните фактори. Формирањето на имунолошки комплекси како иницирачки фактор на инфламацијата, предизвикува ослободување на хемотактични фактори за време на активацијата на *комплемента* коишто ги привлекуваат ПМН.

Со дегранулацијата на првостигнатите неутрофили се ослободуваат хемотаксини, коишто привлекуваат други ПМН. Одредени бактериски продукти се исто така хемотактични за неутрофилите. ПМН партиципираат во инфламаторниот процес со:

1. активна фагоцитоза на микроорганизми и други туѓи материји,
2. активна аеробна гликолиза (која е одговорна за формирање на млечна киселина),
3. ослободување на бројни биолошки активни макромолекули од лизозомите,
4. привлекување на туѓиот материјал и стимулирањето за акумулација и пролиферација на фибробластите кои почнуваат да синтетизираат колаген и овозможуваат да се формира апсцес.

Трета фаза на инфламацијата е *миграција на мононуклеарните клетки* во афицираната регија. Уште во раната клеточна фаза на одговорот, може да се видат мал број на *моноцити* или *макрофаги*, заедно со ПМН.

За време на **последната фаза** пролиферираат фибробластите кои исто така, продуцираат супстанции со чија помош може да се неутрализираат ефектите на некои од хемиските медијатори (ослободени од оштетените маст клетки и базофилите).



Шема бр. 1 Шемаџска илусџирација на оиџиџиџе насџани кои се вклучени во воспалениџо

Како заклучок може да резимираме дека инфламацијата завршува со:

1. комџлејна реџарација и ресџаврација на функцијаџа на зафаџената зона,
2. формирање на аџсес со одредена заџуба на функцијаџа,
3. формирање на џранулом иџо иреџсџавува џусџо џакувана акумулација на инфламаторни клејки кои умираат и деџенерираат (некроџизираат) и кој е џиџичен резулџат на одложениот џиџ на хиџерсензиџивниџе.

Табела бр. 1 Каракџерисџиџи на инфламацијаџа

	Акутна инфламација	Хронична инфламација
Временска секвенца	крајко џрае; јасно дефиниран џочџок и крај	џродолжено џраење со нејасен џочџок и крај
Предоминантни клетки	неуџрофили и некои макрофаџи	лимфоциџи и макрофаџи
Патолошки изглед на ткивото	зацрвениџо (rubor) и оџечено (tumor)	бледо и индурирано
Интерстицијални карактерситики	едем со зџолемена количина на џроџени во џечностиа	зџолемено формирање на колаџен со обелеџување (functio laesa)
Карактеристики на ткивните елементи	брза десџрукција од неуџрофилниџе џроџеолиџички ензими	џосџејена џкивна десџрукција од сџрана на макрофаџниџе ензими и монокини

2.4.3.2. Инфламаторен одговор на пулпиното ткиво

Воспалението во пулпата предизвикано од денталниот кариес започнува кога кариозната лезија се наоѓа во периферните делови на дентинот и пред да настане бактериска инвазија во пулпата. Раните стадиуми на воспалението на пулпата обично се карактеризираат со зголемена васкуларност, особено ако дифузијата на бактериските супстанции е лимитирана. Може да се јави и пролиферација на мали крвни садови, што е карактеристично за хроничниот инфламаторен одговор на пулпиното ткиво.^{136,163}

Микроскопски, реакцијата во пулпата се карактеризира со прекин на одонтобласниот слој, со едем и моноклеарна инфилтрација на пулпиното ткиво.^{16,70,160} Колку се приближува кариозната лезија кон пулпата, малите крвни садови стануваат конгестирани, па едемот станува евидентен.^{127,159,172} Инфламаторните клетки, особено неутрофилите излегуваат од околните мали крвни садови во се поголем број. Овие клетки го “откочуваат” ослободувањето на лизозомални ензими^{61,119,139} од фагоцитните клетки што редоследно доведува до разградба на бактериите и бактериските продукти при што се ослободуваат бактериски антигени.

Со напреднувањето на воспалителниот процес во пулпата се повеќе се зголемува едемот во лимитираниот простор на пулпината комора, па течноста врши притисок на ткивото.²² Клетките се со пореметен сооднос, дел од нив се руптурирани поради притисокот и се оштетени од лизозомалните ензими, а се тоа доведува до нарушување на интегритетот на крвните садови.¹⁴⁶

Во раниот стадиум на воспалението на пулпата, базалната мембрана на ендотелните клетки може да е прекината и да некротизира под дејство на зголемен притисок, додека деструкцијата на сидот на крвните садови доведува до некроза на преостанатите компоненти на пулпата.⁸

Откако бактериите ќе навлезат во пулпата, *хроничниот инфламаторен процес* станува се повеќе *акуен*. Клетките на пулпата почнуваат да изумираат и бројот на полиморфонуклеарните леукоцити драматично се зголемува.¹⁶¹ Како што се шири подрачјето на некрозата, се повеќе се зголемува бројот на фагоцитни клетки, што доведува до **локализирана или дифузна гнојна инфламација**.

При **локализираната гнојна инфламација** се формираат *микроабсцеси* кои се карактеристични за акутното гнојно воспаление. Ексудатот кој се наоѓа во микроабсцесите се нарекува *гној*. Тој се формира кога неутрофилите ги ослободуваат своите лизозомални ензими, па околното ткиво почнува да се разградува (процес познат како *ликвифакциона некроза*). Со зголемувањето на површината на

експозицијата на пулпата и зголемувањето на бројот на бактериите кои навлегуваат во неа, одбранбените способности на пулпата се надминати и тие не можат да се справат со растечката инфекција.

Треба да се има во предвид дека пулпата има терминално крвоснабдување, а со зголемувањето на потребите од воспалителни елементи, способноста на крвта да ги транспортира истите на местото на бактериската пенетрација е ограничено. Бактериите стануваат се помногубројни за одбраната на пулпата, а кога таа ќе биде надмината тие почнуваат непречено да се размножуваат. Ова на крај доведува до **некроза на пулпата**.

Во одредени случаи, акумулацијата на неутрофилите, наместо формирање на апсцес може да доведе до *површина деструкција*, односно *улцерација на пулпата*. Ова се случува кога постои дренажа низ деструираниот дентин. Улкусот претставува ликвефакциона некроза на површината на пулпиното ткиво. Поради фактот што дренажата го заштитува ткивото од зголемен притисок, лезијата има тенденција да остане локализирана и асимптоматска. Базата на улкусот се состои од некротичен дебрис и густа акумулација од неутрофилни леукоцити. Во подлабоките слоеви гранулационото ткиво е инфилтрирано со хронични инфламаторни клетки.

Кај млечни и млади трајни заби ^{29,43,121} со отворен апекс се среќава *хиперпластично воспаление на пулпата*. Тоа се јавува како резултат на кариозна експозиција на пулпата. Со ширењето на кариозната лезија се формира пукнатина на покривот на пулпината комора низ која се дренира воспалителниот ексудат. Кога дренажата е воспоставена, акутното воспаление се намалува и почнува пролиферација на хронично инфламираното пулпино ткиво кое се шири низ отворот на пукнатината, формирајќи *“пулпин полип”*. Клинички, лезијата има изглед на месеста маса која може да ја покрие скоро целата површина од остатокот на коронката на забот.^{5,166}

При воспаление на пулпата настанува клеточно оштетување и нивно изумирање кое е следено со ослободување на неспецифични медијатори на инфламацијата како што се хистамин, брадикинин и метаболити на арахидонската киселина. Исто така се ослободуваат продукти од лизозомалните гранули на полиморфонуклеарите (еластин, катепсин Г и лактоферин), инхибитори на протеазите (како што е антитрипсин) и неуропептиди.

Неуропептидите се протеини кои се создаваат од соматосензорните и автономните нервни влакна, како резултат на повреда. Тука спаѓаат *Substance P*, *Calcitonin gene-related peptide-CGRP* и неурокинини кои потекнуваат од сензорните нервни влакна како и допамин, β хидролаза и неуропептид Y кои потекнуваат од симпатичните нервни влакна. Овие супстанции кои партиципираат во

процесот на инфламација и пренесување на болка, неодамна се откриени во нервните влакна со употреба на имунохистохемиски испитувања.^{22,157}

Познато е дека, дури и едноставна препарација на забите предизвикува ослободување на значајни количини на супстанции слични на *SP* или на брадикинин. Исто така штетните стимули од механички, термален или хемиски карактер кои ги екцитираат *C* влакната, го откочуваат ослободувањето на неуропептидите кои имаат влијание врз пулпиниот крвоток и после тоа на пулпиниот ткивен притисок. Денес е познато дека неуропептидите имаат важна улога во прогресијата на пулпината инфламација. При екцитација на сензорните нерви може да се забележат промени на крвните садови.⁵⁷

McCalahan и сор. (1991) известуваат за присуство на два протеазни инхибитори (α_1 -антитрипсин и α_2 -макроглобулин) во ткивото на хумана дентална пулпа и зголемување на нивната концентрација при акутното воспаление. Ова покажува дека овие протеини имаат одредена улога во патогенезата на инфламаторните заболувања на пулпата.

Кинините кои се одговорни за многу знаци и симптоми на *акуџнојо воспаление*, се произведуваат кога плазматските или ткивните каликреини ќе дојдат во контакт со кининогените. Исто така е пронајдено присуството на една супстанција слична на брадикининот во иритирано пулпино ткиво. Како резултат на клеточното оштетување, фосфолипазата A_2 предизвикува ослободување на арахидонска киселина од клеточните мембрани. Метаболизирањето на арахидонската киселина резултира со формирање на разни простагландини, тромбокساني и леукотриени. Различни метаболити на арахидонската киселина се пронајдени во експериментално, предизвикано воспаление на пулпата. Присуството на овие метаболити во инфламирана пулпа укажува дека тие допринесуваат во процесот на воспалението.²³

Маст клетките се сметаат за главен извор на хистамин. Овие клетки се најдени во инфламирана пулпа. Физичкото оштетување на маст клетките или поврзувањето на две IgE молекули со антиген на нивната површина, резултира со ослободување на хистамин и други супстанции кои ги има во гранулите на маст клетките. Присуството на хистаминот во сидот на крвните садови и неговото значајно зголемување укажува на неговата важна патофизиолошка улога во инфламацијата на пулпата.^{80,174}

По оштетувањето на пулпата, ослободените антигени се врзуваат за специфични антитела и формираат *имуни комплекси*, коишто заедно со бактериските ендотоксини го фиксираат комплементот присутен во ткивните течности. Ова ја активира каскадата на *комплементиој*, што доведува до ослободување на додатни хемотактични супстанции,

анафилотоксини и други поттикнувачи на инфламаторната реакција во пулпното ткиво.¹⁰ Кога ќе се активира системот на комплементот тој предизвикува зголемена фагоцитоза, зголемена васкуларна пермеабилност и лиза на клеточни антигени. Присуството на C3 фрагментот од комплемент во инфламирана пулпа укажува дека овој систем учествува во патогенезата на воспаленето на пулпата.¹¹⁶

2.4.4. Имунолошки реакции на пулпното ткиво

2.4.4.1. Клетки и ткива на имунолошкиот систем

Најзначаен механизам за преживување кај човекот е имунолошкиот систем кој е создаден да препознава, нападне и уништи која било туѓа материја што ќе навлезе во телото. Хуманиот имунолошки систем може специфично да одговори и да реагира со огромен број различни антигени (почнувајќи од протеини, преку полипептиди, па се до микроорганизми и туѓи ткива).

Имунолошкиот систем се состои од два функционални дела: *вроден имунолошки систем* и *стекнат имунолошки систем*.

Вродениот и стекнатиот имунолошки систем се состојат од множество на молекули и клетки дистрибуирани низ телото. Најважни клетки се *леукоцитите* (бели крвни клетки). Тие се делат на две главни класи: *фагоцити* (како што се неутрофилните леукоцити и моноцити или макрофаги), кои се дел од вродениот имунолошки систем и *лимфоцити* кои “*посредуваат*” во стекнатиот имунолошки систем. Лимфоидните клетки на имунолошкиот систем се организирани во лимфоидни ткива и органи. Стекнатиот имунолошки систем ги “*памети*” туѓите антигени, како и антигените на инфективните агенси и спречува подоцна да се јави заболување. Две најважни својства на овој систем се *специфичноста* и *меморијата*.¹⁴¹

2.4.4.2. Вроден имунолошки систем

Вродениот имунитет служи како прва линија на одбрана против инфекциите, елиминирајќи ги повеќето потенцијални патогени пред тие да предизвикаат инфекција. Ако оваа одбрана е неуспешна се активира стекнатиот имунолошки систем, кој предизвикува специфични имунолошки реакции за секој инфективен агенс, којшто најчесто е елиминиран. Вродениот имунолошки систем се состои од бројни анатомски, микробиолошки, физиолошки и инфламаторни ефектори. Организмот продуцира клетки кои вршат фагоцитоза на молекули или партикли и синтетизираат молекули што ги деградираат, денатурираат и инактивираат штетните агенси. Фагоцитозата и продукцијата на овие супстанции се неспецифичен механизам на одбрана, бидејќи организмот го користи истото лимитирано оружје против сите агенси без

разлика на нивната сложеност. Овие вообичаени, неспецифични активности го сочинуваат вродениот физиолошки процес, наречен инфламација. Таа се опишува како неспецифична, затоа што истите реакции се јавуваат без разлика на стимулирачкиот фактор.

Акутна инфламација е краткотраен, јасно дефиниран процес и нејзина цел е елиминација на штетниот стимуланс и отстранување на оштетеното ткиво.

Хронична инфламација трае подолго и има помалку јасно дефиниран почеток и крај, отколку акутната инфламација. Предоминантни ефекторни клетки се макрофагите. Тие генерираат цитокини што ја афицираат крвната циркулација и клеточниот раст, како и протеолитични ензими кои не делуваат толку брзо, но поконтинуирано отколку оние на неутрофилите.

2.4.4.3. Стекнат имунолошки систем

Стекнатиот имунолошки систем е составен од бројни молекули и клетки, кои се способни да го препознаат и разликуваат туѓиот антиген. Овој одговор се состои од серија клеточни интеракции предизвикани од специфични клеточни продукти. Функционалните способности на стекнатиот имунолошки систем се состојат од:

1. *препознавање на бројни различни туѓи супстанции,*
2. *брза синтеза на имунолошки продукти при контакт со инфективни агенси што резултира со зголемена пролиферација и диференцијација на клетките специфични за антигенот и продукција на специфични имуни молекули,*
3. *испорачување на имунолошките продукти на местото на инфекцијата,*
4. *различност на ефекторните одбранбени механизми што доведуваат до хипероѓеницитите на индуцираниот клеточни типови и молекули кои треба да се справат со инфективни агенси,*
5. *насочување на одбранбени механизми специфично кон инфективните и нивни агенси (а не кон своите),*
6. *механизми на деактивација на системот кога инфекцијата е отстранета.*

Имунолошките реакции може да се поделат во две главни категории: *хуморални* и *клеточно* посредувани одговори. Главна карактеристика на *хуморалниот* имунитет е продукција на антитела (протеини кои се специфични да реагираат со стимулирачкиот материјал, антигенот). *Клеточно* посредуваниот имунитет се состои од спектар на активности засновани од потребата да бидат присутни вијабилни ефекторни клетки.

Антиген или имуноген се дефинира како материјал, способен да предизвика имунолошки одговор кога тој е претставен на имунокомпетентниот домаќин за кого претставува туѓ материјал.

Во глобален план, заштитата од страна на хуморалните антитела (имуноглобулините) е ефикасна против агенсите кои се наоѓаат екстрацелуларно. Спротивно на ова, интрацелуларните паразитарни инфекции, во принцип, се решаваат со клеточно посредуваниот имунитет.

Антителата се гликопротеини, претставници на стекнатиот имунолошки систем. Тие се поврзуваат специфично за туѓите антигени, како што се бактерии, вируси и токсини.²⁷

2.4.4.4. Лимфоцити

Лимфоцитите потекнуваат од лимфоидните прекурсори и имаат карактеристична тркалезна форма, компактно јадро и малку цитоплазма. Постојат две главни субпопулации, Т и Б лимфоцити и некои помалку дефинирани категории на лимфоцити. Тие не можат да фагоцитираат; не се многу подвижни, синтетизираат протеини, но помалку протеолитични ензими. Лимфоцитите потекнуваат од заедничка мултипотентна матична клетка која е способна да се диференцира во различни клеточни линии (еритроцити, тромбоцити, гранулоцити, макрофаги и лимфоцити). Возрасен човек просечно има 10^{11} лимфоидни клетки и лимфното ткиво во целина сочинува 2% од вкупната тежина на телото.

Лимфоцитите се произведуваат во примарните лимфоидни органи како што се коскената срцевина и тимусот. Околу 20%-30% од сите циркулирачки клетки се лимфоцити и повеќето од нив имаат карактеристика долго да живеат. Овие лимфоцити може да се поделат во две главни категории: *мали* и *големи лимфоцити*. *Малиите лимфоцити* имаат дијаметар од 8 до 10 μ m и висок нуклеарно-цитоплазматски однос (*N/C ratio*) и немаат цитоплазматски гранули. Тие понатаму се делат во две класи, Т и Б лимфоцити, врз основа на нивната функција. *Големите гранулирани лимфоцити* имаат дијаметар до 16 μ m, помал нуклеарно-цитоплазматски однос и содржат цитоплазматски гранули.

Клетките на имунолошкиот систем потекнуваат од плурипотентна матична клетка која се дели на: лимфоидна линија (лимфоцити) и миелоидна линија (фагоцити). Овие клетки се здружуваат во организирани ткива и органи, како што се слезенката, лимфните јазли, Пајеровите плочи во интестиналниот систем, крајниците, тимусот и коскената срцевина.

Поединечните лимфоцити се специјализирани да одговорат на ограничена (лимитирана) група на структурно сродни антигени. Овој

одговор е вроден кај секоја поединечна клетка и тој постои и пред првиот контакт со антигенот. Оваа специфичност на одговорот се должи на мембранските рецептори на клетките кои го препознаваат антигенот. Лимфоцитите експресираат голем број фенотипски маркери на нивната површина. Некои се јавуваат во поединечни етапи од клеточната диференцијација или пак се експресираат во кратки временски периоди со тек на развојот, додека други се карактеристични за различни клеточни линии.

Молекулите со чија помош може да се разликуваат клеточните популации се идентифицираат со специфични моноклонали антитела. Терминот кластерна детерминанта (CD - *cluster of differentiation*) првпат е прифатен на еден интернационален семинар¹²⁹, каде се разгледувале типовите на обојување од различни антитела на леукоцитите и карактеристиките на молекулите кои се идентифицирани од овие антитела. Денес се употребува ознаката CD и до него број со кој се покажува специфичната молекула која се препознава од одредена група на моноклонални антитела. Значи, антигените на клеточната површина кои се идентифицираат со помош на моноклоналните антитела се означуваат со CD ознаки. Во повеќето случаи функциите на овие молекули се познати, на пример, маркерот CD3 е ознака за дел од рецепторскиот комплекс на T клетките.

2.4.4.5. Б лимфоцити

Б лимфоцитите сочинуваат околу 5%-15% од циркулирачките нуклеарни клетки во нормална крв. Класично, тие се идентифицираат со помош на нивните површни имуноглобулини (sIg) кои се синтетизираат ендогено и служат како рецептор за антигенот. Најголемиот број на нестимулирани (*resting*) Б клетки на својата површина имаат IgM^+ и IgD^+ , при што IgD^+ има тенденција да се изгуби набрзо после активацијата. Помалиот број на Б клетки на својата површина експресираат IgG , IgA или IgE . Во лимфоидните ткива кои се асоцирани со мукозите (*mucosal-associated lymphoid tissues*), најголемиот број на Б клетки експресираат IgA на својата површина, како свој sIg.

CD маркерите кои најчесто се употребуваат за да се идентифицираат Б клетките се $CD19$, $CD20$ и $CD21$ (табела бр 2).

Хуманите Б лимфоцити многу рано созреваат (матурационен ефект) и подлегнуваат на реаранжман на гените (*gene rearrangements*) за да можат да произведуваат имуноглобулини.

Мали, нестимулирани (*resting*) Б клетки носат приближно 10^5 површни имуноглобулини. Секој од нив е хетеродимер, со два лесни и два тешки ланци, додека секој ланец се состои од варијабилен и константен домен.

Табела бр. 2 Карактеристики на Б клеточното зреење

Стадиум	Генска реорганиз	cIg	mIg	MHC-II	FcR	CD9	CD10	CD19	CD20	CD21	CD35
Матична кл.	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
Пре-Б кл.	+	μ	-	+	-	+	+	+	+	-	+/-
Незрела Б клетка	+	+	IgM	+	-	+	-	+	+	-	+/-
Зрела Б клетка	+	+	IgM IgD	+	+	-	-	+	+	+	+
Активна рана Б кл.	+	+	++	+	++	-	-	+	+	+	++
Плазма кл.	+	++	-	-	-	+	-	+	+	-	-

Активацијата и следствената диференцијација предизвикуваат антиген-стимулираните Б лимфоцити да поминат во плазма клетки кои секретираат антитела во телесните течности. Тие можат да произведат и ослободат илјадници молекули во една секунда. Еден од најфасцинантните аспекти на Б лимфоцитите е нивниот хетерогеницитет, при што тие се разликуваат во однос на специфичноста на нивните места за врзувањето со антигенот. Значајно е да се каже дека не повеќе од две Б клетки од вкупниот број на 10^8 во телото на возрасен човек, се идентични по оваа основа.

Б клеточната популација е функционално многу повеќе хетерогена отколку онаа на Т клетките. После активацијата, Б лимфоцитите преминуваат било во плазма клетки со краток живот кои продуцираат антитела било во клетки кои паметат (*memory cells*) и имаат способност долго да живеат. По неколку дена од производството и ослободувањето на Ig молекули секоја поединечна плазма клетка (терминално диференцирана Б клетка) умира, без понатамошна репродукција. Клетките што паметат, во повторен контакт со антигенот, може многу брзо да се мултиплицираат, но не може активно да ситетизираат антитела.

2.4.4.6. Т лимфоцити

Развојот на Т лимфоцитите претпоставува дека тие своите карактеристики ги стекнуваат минувајќи низ тимусот. Со тоа се создава доволен број на предодредени прекурсорни клетки со кои нивоата на Т клетки во организмот може да се одржуваат во задоволителен број во текот на целиот живот, дури и кога тимусот ќе инволуира, а циркулирачките лимфоцити, дури 60%-80% се Т клетки.

Како и Б клетките, Т клетките може да се диференцираат и да созреат само во строго специјализирана околина. Мултипотентните клетки или пре-Т клетките се развиваат во коскената срцевина или феталниот црн дроб и потоа мигрираат во тимусот. Најраниот диференцијационен настан, кој настанува во тимичниот кортекс, е стекнувањето на CD2 и CD3 рецепторите. Понатамошната

диференцијација настанува кога Т клетките минуваат во медулата, при што се диференцираат две различни субпопулации: T_{HI} (*helper-inducer* Т клетки - CD4 позитивни) и T_{CS} (*cytotoxic/suppressor* Т клетки - CD8 позитивни).

Табела бр. 3 Карактеристики на Т клеточното зреење

Стадиум	% од вк. број	CD1	CD2	CD3	CD4	CD5	CD8	CD25	CD38	CD71	TdT
Матична кл.	НА*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Пре-Т клетка	НА*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Тимоцити											
Надв. кортекс	10-20	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Внатр. кортекс	70	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
Медула	10-20	-	+	+/-	+/-	+	+/-	-	+	-	-
Периф. Т кл.											
Кл. кои мируваат	70	-	+	+	+/-	+	+/-	-	-	-	-
Активирани		-	-	-	+/-	-	+/-	+	-	+	-

* НА, не анализирано

Околу 90% од Т клетките умираат интратимично и никогаш не навлегуваат во периферната циркулација. Сепак, најзначаен ефект од интратимичната диференцијација е дека Т клетките научуваат да ги распознаваат сопствените генски продукти на *MHC* што е од витална важност за целуларните интеракции во имунолошките одговори. На крај, матурираните лимфоцити го напуштаат тимусот и преку крвотокот ги населуваат периферните лимфоидни органи.

Тие се асоцирани со два типа на имунолошки функции:

1. **Ефекторна** - активности како што е убивање на инфицираните клетки и туморските клетки
2. **Регулаторна** - оваа функција се огледа во способноста да го амплифицира (зголеми) или супримира имунолошкиот одговор преку создавање на цитокини или создавање на други ефекторни лимфоцити (вклучувајќи ги Т и Б клетките). Субсетовите, T_{HI} и T_{CS} клетките се вклучени во регулирањето на имунолошкиот одговор, соработувајќи со Б клетките во индукција на синетезата на анитела, ослободување на лимфокини кои може да ги активираат макрофагите и помагајќи во елиминација на многу интрацелуларни и вирални патогени.

Повеќето циркулирачки Т клетки експресираат три од следните CD маркери:

1. CD2 - рецептор за овчји еритроцити
2. CD3 - Т клеточен рецептор

3. CD4 - рецептор за *MHC class II* молекулите
4. CD8 - рецептор за *MHC class I* молекулите

Т лимфоцитите ги распознаваат специфичните антигени преку комплекс на мембрански протеини, наречен Т-клеточен рецептор кој има два дела: *TCR* и *CD3*.

TCR го идентифицира идиотипот на специфичниот антиген, додека *CD3*, кој е присутен на сите Т клетки, најверојатно, помага да се пренесе пораката во внатрешноста на клетката кога *TCR* се врзал за соодветниот антиген. Важно е да се каже дека Т клетките го препознаваат антигенот само кога тој е презентираан од страна на антиген-презентирачките клетки во асоцијација со *class I* или *class II MHC* (*Major Histocompatibility Complex*).

CD4 позитивните клетки кои главно се вклучени во имунолошката стимулација и во ткивните реакции на одложениот тип на хиперсензитивитет имаат потреба од *class II MHC*, додека *CD8* позитивните клетки изведуваат супресорни и цитотоксични активности и имаат потреба од *class I MHC*.

Иако Т клетките како популација изгледа дека се способни да синтетизираат многу лимфокини,³⁵ поединечни Т клетки имаат способност да синтетизираат само мал репертоар на индивидуални лимфокини. На пример, *CD4* позитивните клетки ослободуваат *IL-2* и *IFN γ* , но не секретираат *IL-4* или *IL-5*. Овие субсетови се дефинирани како *T_{H1}* и *T_{H2}* клетки, при што првите се вклучени во реакциите на одложениот хиперсензитивитет, додека вторите се одговорни за соработката помеѓу Т и Б клетките.¹²²

2.4.4.7. Клетки природни убијци (*Natural killer cells - NK*)

Околу 5% од лимфоцитите во крвта не поседуваат мембрански *Ig* кои се карактеристични за Б клетките, ниту пак поседуваат фенотипови кои се карактеристични за Т клетките. Овие клетки се наречени нулта (*null*) клетки и некои од нив денес се идентифицирани како *NK* клетки.

Тие имаат способност да ги лизираат целните (*target*) клетки без разлика на нивната антигена специфичност, експресијата на *MHC*, или пак претходната експозиција. Овие клетки се леукоцити кои препознаваат промени на клеточната површина кои се забележуваат кај некои вирусно инфицирани клетки и понекои туморски клетки. Тие се врзуваат за овие клетки и ги убиваат. Овој тип на реакција во кој лимфоцитите ги убиваат целните клетки се нарекува *цитотоксичност*. Тие ги напаѓаат клетките со кои немале претходно никакво искуство, така што овој меѓуклеточен контакт не води до зголемена активација или паметење. Нивната активност може да се зголеми кога постои уште

поголема имунолошка активност, при што имунолошките реакции создаваат цитокини кои ја појачуваат активноста на *NK* клетките, како што се *IFN γ* (продукт на антигено стимулирани Т клетки) и *IL-2* (продукт на Т клетки што се експонирани од влијанието на *IL-1*).

2.4.4.8. Системот на комплемент

Компонентите на комплементот се комплексна група на ензими кои заедно со антителата или други фактори играат значајна улога во имунолошките и алергиските реакции. Реакциите каде што тој партиципира се хуморални (на пр., во крвниот серум или во телесните течности). Туѓите антигени се идентифицираат како “туѓи” со помош на антителата што го активираат комплементот. Понатаму, комплементот ги напаѓа обележените “туѓи” антигени. Тој може да биде активиран од плазминот, трипсинот и комплексите на антиген-антитело. Со неговата активација тој не само што ги напаѓа туѓите антигени туку и сопствените клетки. За среќа, оваа самодеструирачка активност е редуцирана со помош на фиксацијата на комплементот на површината на клетките кои го инвадираат телото на домаќинот. Постојат девет степени во каскадата на комплементот. Неговите протеини се означени со буквата С и до неа број: C_1, C_2, C_3 се до C_9 .

Кога клетките се нападнати од комплементот тие го зголемуваат својот волумен (“отекуваат”), се додека на крај не руптурираат.

Споредните продукти од активацијата на комплементот имаат важни улоги во инфламацијата. Фрагментите C_{3a} и C_{5a} предизвикуваат зголемена васкуларна пермеабилност со помош на ослободување на хистамин од леукоцитите, маст клетките и тромбоцитите. Првиот, исто така може да индуцира леукоцитоза и да помогне да се забрза фагоцитозата, додека вториот е важен хемотактичен фактор.⁶⁷

2.5. ИМУНОЛОШКИ АСПЕКТИ НА ДЕНТАЛНИОТ ПЛАК, КАРИЕСОТ И ПУЛПИНАТА ИНФЕКЦИЈА

2.5.1. Имунолошки аспекти на денталниот плак

Денталниот плак содржи бројни антигени, од кои поголемиот дел се Т-зависни антигени (на пр., стрептококниот гликопротеин од површината на клетката). Некои антигени може да реагираат директно со Б клетките и се сметаат како Т-независни антигени (на пр., липополисахаридите од грам негативните бактерии). Предуслов за да отпочне имунолошката реакција е антигенот да се поврзе со антиген-презентиращка клетка,⁵⁴ во која ќе биде внесен и обработен. *Макрофагите*, *Ланџерхансовите* *клејки* и *Дендритичните* *клејки* се најчесто вклучени во неспецифичното внесување на антигените во

мембранските вдлабнатини. Тие понатаму се внесуваат во фагозоми, кои се поврзуваат со лизозомите за да формираат фаголизозоми, во кои антигенот е подложен на хидролитична разградба од лизозомалните ензими.

Туѓите антигени детерминанти кои се врзани за HLA антигенот (*Human Leukocyte Antigens*), понатаму се експресираат на клеточната површина, со што се спремни за презентација на Т-клеточните рецептори од CD4 или CD8 клетките. HLA-антиген комплексот ќе биде препознаен само од Т клетките што се сензибилизирани за тој специфичен антиген (имаат специфични Т клеточни рецептори). Со други зборови, Т клеточниот рецептор го препознава туѓиот антиген само аке е поврзан со неговиот сопствен HLA, и оваа појава се означува како HLA рестрикција.⁶⁷



Шема бр. 2 Ефекѓиоѓ на дваѓа ѓлавни сосѓавни делови на ѓлакоѓѓ врз имунолошкиоѓ одѓговор и развојоѓ на кариесоѓѓ

Б клетките може исто така да се поврзуваат, да процесираат и да презентираат антигени, но само во секундарниот одговор во кој Б клетките експресираат специфични мембрански антитела. Антигенот ќе биде фатен специфично само од Б клетките што го поседуваат соодветното антитело и потоа ќе биде внесен, процесѓран и поврзан за

HLA и повторно реекспресиран на површината од клетката. Неспецифичната макрофагна презентација или специфичната Б клеточна презентација, настанува со посредство на антиген-HLA комплексот кој понатаму го предава на соодветниот Т клеточен рецептор. Сигналот понатаму се пренесува преку CD3 комплексот во Т клетката. Понатаму, макрофагите ослободуваат IL-1¹⁴⁷ кој може да дејствува како втор сигнал покрај оној од комплексот на антиген-HLA комплексот и да ги предизвика Т клетките да експресираат IL-2 рецептори, како и да стимулираат IL-2 продукција.¹¹⁸ На овој начин се активира Т клеточната пролиферација по автокрин пат. CD4 клеточната интеракција со Б клетките помага да се произведат антитела.

2.5.2. Имунолошки аспекти на денталниот кариес

Како резултат на промените во дентинот, пулпата произведува антитела против антигените компоненти на денталниот кариес.^{148,162}

Okamura и сор.(1979), испитувајќи ги серумските протеини и секреторната компонента кај хуман кариозен дентин со помош на имунопероксидазниот метод, утврдиле дека во плитката кариозна лезија биле присутни албумин, трансферин, IgG, IgA и секреторната компонента. Секреторната компонента во длабоките кариозни лезии не можела да се детектира, додека IgG, IgA, албуминот и трансферинот покажувале специфични реакции на одонтобласните продолжоци.

За разлика од наодите на *Okamura* и сор., *Ackermans* и сор.(1981) го потврдиле присуството на секреторната компонента и IgA како кај површните кариозни лезии така и во длабоките слоеви на кариозниот дентин. Овие наоди сугерираат дека IgA во дентинот е од саливарно потекло. Присуството на имуноглобулините во кариозниот дентин и одонтобласните, укажува на тоа дека секреторниот IgA доаѓа од плунката, додека IgG и IgM, потекнуваат од серумот, гингивалниот флуид или плунката.^{40,145,150} Локализацијата на овие имуоглобулини во дентинот се јавува како резултат на деструктивните стимулации на кариесот. Овие имуноглобулини во дентинот можат да одговорат на бактериската инвазија, на тој начин што ги прават тубулите непогодни за бактериите.

Okamura и сор. (1980) го испитувале потеклото на имуноглобулините IgG, IgM и IgA, компонентите C₃ и C₄ на комплементот и секреторната компонента, во дентинот со помош на светлосен и електронски микроскоп и имуохистохемиски испитувања, во цитоплазмата на одонтобласните, во соседните пулпини клетки и во дентинот. Овие компоненти се способни да реагираат против микроорганизмите кои навлегуваат од кариозната лезија. Тие утврдиле дека имуноглобулините се физиолошки локализирани во дентинот како

резултат на стимулите од кариозната лезија. Протеините кои се локализирани во длабоката кариозна лезија се транспортираат од пулпата, најверојатно, со помош на одонобластите. Имуноглобулините во дентинот се способни да реагираат со бактериите што ги инвадираат дентинските тубули.

Истиот автор,⁹² во своето следно истражување, ги испитувал имуноглобулините во дентинот и промената на нивната локализација во текот на кариозниот процес. Притоа утврдил дека имуноглобулините биле локализирани во дентинот уште во почетниот стадиум на кариесот, пред да има клинички знаци за него. Во овој стадиум, имуноглобулините биле локализирани во одонтобласниот слој. Како што напредува кариозната лезија, концентрацијата на имуноглобулините расте во дентинските тубули, додека во одонтобласниот слој се намалува. Бидејќи во пулпата не се пронајдени плазма клетки, авторот заклучува дека, имуноглобулините во одонтобласниот слој и дентинските тубули кај почетниот кариес не потекнуваат од клетките во пулпата кои создаваат антитела, туку од крвниот серум.

Hahn и сор. (1997) испитувале како влијаат имуноглобулините врз пермеабилитетот на дентинот, со помош на имунохистохемскиот метод. Притоа утврдиле дека имуноглобулините биле локализирани во дентинските тубули најмногу околу роговите на пулпата, бидејќи во овие делови има најголема концентрација на тубули со најголем дијаметар и тука коронките имаат најмала дебелина на дентинот. Резултатите покажале дека имуноглобулините од дентинската течност се депонираат во сидовите на тубулите, и можат со тек на време да ја редуцираат пермеабилноста на дентинот и со тоа да ја заштитат пулпата од инвазија на бактериски антигени или нивни токсични нус-производи од кариозната лезија.

Присуството на бактериските антигени и имуноглобулини во дентинот¹¹¹ покажува дека во текот на кариозниот процес е вклучен и специфичниот имунолошки систем.

2.5.3. Имунолошки аспекти на пулпината инфекција

Порано, општо беше прифатено гледиштето дека хуманата дентална пулпа кај здрави заби не содржи имунокомпетентни клетки. Меѓутоа, ова гледиште е напуштено со податоците добиени од бројни имунохистохемски испитувања на здрави заби. Пронајдено е дека се присутни Т клетки, со **CD4** (*helper/inducer*) и **CD8** (*cytotoxic/suppressor*) субсетови кои покажале сооднос 1:2, кој е обратен од тој што е пронајден во циркулацијата. Овие Т клетки, поверојатно е дека се рециркулирачки отколку резидентни клетки.

До пред десетина години, нашето познавање за хуморалниот имунолошки одговор на денталната пулпа беше доста лимитирано. Зачудувачки е дека Б клетки не се пронајдени во здрава пулпа, а се појавуваат при инфламаторните реакции во пулпата.

Правени се бројни студии во кои е испитувано присуството на имуноглобулините како во здрава така и во воспалена пулпа. Некои автори¹¹⁵ тврдат дека здрава пулпа не содржи имуноглобулини.

Во поновите испитувања во кои се користени посоефицицирани методи како што е имунохистохемиската техника, имунодифузијата и *ELISA (enzyme-linked immunoadsorbent assay)* методот, пронајдено е дека и во здрава пулпа има мали концентрации на имуноглобулини, а нивната концентрација значително се зголемува при разни инфламаторни заболувања на пулпата.⁸⁵ Притоа кај инфламираните пулпи, биле идентифицирани бројни клетки кои содржат имуноглобулини, и тоа главно *IgG*.

Pekovic и сор. (1987) нашле присуство на бактериски антигени и имуни комплекси во воспалена пулпа. Поради фактот што ткивото кај воспалена пулпа е исполнето со имунокомпетентни клетки (Т лимфоцити, Б лимфоцити, плазма клетки и макрофаги), може да се претпостави дека имуноглобулините се јавуваат како резултат на локална синтеза. Многу е важна специфичноста на овие имуноглобулински молекули, а се со цел да се разбере нивната улога во кариозниот процес.

Falkler и сор. (1987) ја испитувале специфичноста на имуноглобулините кои биле добиени од супернатантот од екстракт на пулпино ткивна култура, со употреба на *ELISA* методот. Притоа тие употребиле 16 различни орални микроорганизми. Позитивна реакција била најдена кај *S. mutans*, *A. naeslundii*, *A. israeli*, *L. casei*, *E. alactolyticum*, *P. micros*, *B. intermedius* и *V. parvula*. Овие испитувања покажале дека имуноглобулините кои се присутни во пулпата реагираат со микроорганизмите кои се изолирани од кариозните лезии.

Исто така, во здрава пулпа, идентифицирани се макрофаги и дендритични клетки кои експресираат *HLA class II* антигени. Битно е да се истакне дека ендотелните клетки на пулпините крвни садови експресираат *HLA class II* антигени, што им овозможува да учествуваат во презентацијата на антигенот. Здравата пулпа содржи антиген презентирачки клетки кои можат да го презентираат антигенот на Т клетките, со што тие земаат учество во имунолошкиот одговор кон инвадирачките микроорганизми.

Кога антигенот ќе навлезе преку дентинските тубули, тој доаѓа во контакт со дендритичните клетки кои се стратешки распоредени на периферијата на пулпата. Тие вршат процесирање на антигенот и мигрираат во регионалните лимфни јазли, каде матурираат и се

здобиваат со способноста да го презентираат антигенот и да им дадат ко-стимулаторен сигнал на нативните Т клетки. Вака стимулирани Т клетките ќе почнат клонално да се множат, и да го напуштаат лимфниот јазол за да се вратат повторно како Т клетки кои “памтат”. Понатаму, тие кружат низ периферните ткива.

Ако антигениот стимуланс перзистира и понатаму, како при хроничната инфекција од несанирана кариозна лезија, стимулираните Т и Б лимфоцити кои се дојдени како имунолошки одговор од лимфните јазли, може да излезат во пулпиното ткиво и да одговорат специфично на антигенот. Исто така, тука може да навлезат и плазма клетки, што продуцираат антитела “ин ситу”.

Според *Fleming (1985)*, кога антиген ќе навлезе во нелимфоидни ткива, имунолошкиот одговор се одвива во локалните лимфни јазли. Ако антигенот перзистира во неговиот оригинален облик, како кај хроничната инфекција, примарните Т и Б клетки добиени како резултат на имунолошкиот одговор во лимфните јазли, навлегуваат во ткивото и можат специфично да одговорат на антигенот. Во ткивото, исто така се присутни и бројни плазма клетки кои произведуваат антитела ин ситу.

Развојот на кариесот во дентинот и/или пулпата, неизбежно доведува до *локален имунолошки одговор* во пулпиното ткиво. Овој одговор може да биде стимулиран од вијабилни бактерии или од солубилни бактериски компоненти (делови од клеточниот ѕид, липополисахариди и токсини) кои пенетрираат во пулпата преку отворените дентински тубули. При акутна пулпина инфекција се јавува неспецифичен инфламаторен одговор, во кој доминираат полиморфонуклеарните леукоцити (ПМН). Како инфекцијата станува се повеќе хронична, се јавува *специфичен антибактериски имунолошки одговор*, кој се состои од лимфоцити и нивните активирани бласт форми, макрофаги и плазма клетки. Присуството на мононуклеарни и полиморфонуклеарни клетки е типично за мешан одговор на хроничната инфекција.^{68,142}

2.6. ИМУНОХИСТОХЕМИСКИ ИСПИТУВАЊА НА ПУЛПАТА

Во последните петнаесет години новите откритија во имунологијата имаат големо влијание врз скоро секоја клиничка дисциплина во медицината. Во стоматологијата, значајни имунолошки испитувања се направени во областа на оралната патологија и пародонтологија, меѓутоа, релативно скудни сознанија има за имунолошкиот одговор на хуманата дентална пулпа како резултат на кариозниот процес.

Клеточната структура на денталната пулпа, во последната деценија е детално проучена, при што е утврдено дека различни типови

на инфламаторни и имунокомпетентни клетки како што се макрофагите, се присутни во здрава пулпа. Меѓутоа, многу е важно да се одреди точната дистрибуција на овие клетки, во смисла на разјаснување на механизмите кои се вклучени во иницијалните одбрамбени реакции на пулпата против бактериските иритатори. Познато е дека примарниот етиолошки фактор на заболувањата на пулпата е продирањето на микроорганизмите во пулпата, најчесто преку кариозниот дентин. После егзогената инвазија на микроорганизмите и одбранбените реакции на домаќинот, како што се инфламаторните реакции и имунолошките одговори, се јавуваат во пулпата на ист начин, како и во другите сврзни ткива, а се со цел да се елиминираат тугите патогени и да се одржи локалната хомеостаза на пулпата.

Како резултат на присуството на микроорганизмите во дентинот, во пулпата може да се видат различни имунокомпетентни клетки. Зачудувачки е дека воспалението на пулпата како резултат на кариозниот процес, започнува како слаб хроничен воспалителен одговор на кого му недостасува акутната фаза. Во почетокот таа е инфилтрирана со хронични инфламаторни клетки како што се лимфоцити, макрофаги и плазма клетки.^{5,55} Бројот на овие клетки се зголемува со напредувањето на кариозниот процес кон пулпата. Карактеристичен наод е дека, имунокомпетентните клетки се побројни во коронарниот отколку во радикуларниот дел на пулпата.

Полиморфонуклеарните леукоцити кои се преобладајќи клетки на местото на пулпината експозиција, се одраз на акутниот инфламаторен одговор што се јавува подоцна, од хроничните инфламаторни клетки кои се присутни во ткивото на пулпата многу порано.¹⁶⁵

Okamura и сор. (1995) вршеле испитувања за присуството на вазомоторните нерви во микроваскулатурата на здрава хумана пулпа со помош на моноклонални антитела усмерени кон S-100 протеинот и неурон-специфичната енолаза (NSE). Притоа тие нашле два типа на нервни завршоци околу микроваскулатурата на пулпата. Првиот тип биле слободни завршоци кои ја сочинуваат главната неурална компонента и се дистрибуирани во сите типови на мали крвни садови како што се артериолите, венулите и капиларите, и вториот помалку чест тип, кој го нарекле *варикозни завршоци* кои се наоѓале само во артериолите. Со помош на ова испитување тие заклучиле дека последните претставуваат терминални аксони на еферентните вазомоторни нерви. Овие наоди сугерираат дека постои интимна структурна асоцијација помеѓу вазомоторните нерви и артериолите во регулацијата на микроциркулација во хуманата дентална пулпа.

Jontell и сор. (1987) вршеле испитувања за присуството и локализацијата на различни имунокомпетентни клетки во здрава хумана

пулпа, при што со помош на моноклонални антитела се испитувани сите периферни Т клетки, *helper/inducer* Т клетки, *cytotoxic/suppressor* Т клетки, макрофаги, Б клетки и дендритични клетки кои експресираат класа II антигени (*HLA-DR,-DQ*). Притоа било утврдено дека дендритичните клетки се локализирани под одонтобласниот слој, како и во централните делови на пулпиното ткиво. Т лимфоцитите, кои биле поделени во двете погоре споменати групи, се пронајдени во сите анализирани примероци на пулпиното ткиво, додека Б клетките не се пронајдени во ни еден испитан примерок од пулпите. Овие податоци укажуваат дека хуманата дентална пулпа е добро опремена со имунокомпетентни клетки кои се неопходни за иницирање на имунолошкиот одговор.

Нивните резултати го поништуваат поранешното тврдење на *Seltzer* и *Bender* (1984) дека во здрава пулпа нема имунокомпетентни клетки.

Jontell и сор. (1988) вршеле испитувања за присуство на *class II (Ia)* антиген презентирачки клетки, во здрава пулпа кај стаорци. Притоа, тие идентифицирале два типа на антиген презентирачки клетки, едниот, со нагласен *дендритичен изглед*, а се локализирани на периферијата од пулпиното ткиво, а другиот, со морфолошки карактеристики слични на *макрофагите*. Последните најчесто се наоѓаат во централните делови на пулпата. Односот на овие два типа на клетки изнесувал 1:4. Авторите заклучуваат дека присуството на овие два типа на клетки укажува на вродениот капацитет на пулпата да ги процесира и презентира туѓите антигени.

Okiji и сор. (1992) ја испитувале точната дистрибуција на различните имунокомпетентни клетки, во пулпи од стаорци, со употреба на седум различни моноклонални антитела. Клетките кои наликуваат на макрофаги биле преобладајќи во централниот дел на пулпата, додека клетките кои имаат дендритичен изглед обично се наоѓале на периферијата на пулпата. Исто така, биле детектирани и мал број на Т лимфоцити и плазма клетки. Од добиените резултати, авторите заклучуваат дека здравата дентална пулпа содржи множество на имунокомпетентни клетки, со макрофагите како доминантен вид. Следствено, по егзогената инвазија на патогени стимуланси во пулпата овие клетки учествуваат во одбранбените реакции како фагоцити или антиген презентирачки клетки, кои се есенцијални за иницијацијата на имунолошкиот одговор.

Јасното присуство на Т клетките и макрофагите (*Jontell* и сор. 1987, 1988, *Okiji* и сор. 1992, и *Сотирировска-Ивковска* и сор. 1997) како и отсуството на Б клетките (*Jontell* и сор. 1987, *Сотирировска-Ивковска* и сор. 1997) во здрава пулпа, сугерираат дека клеточно-посредуваниот имунитет игра примарна улога во имунолошкиот надзор во денталната пулпа.

Hahn и сор. (1989) вршеле испитувања на здрава, реверзибилно оштетена и иреверзибилно оштетена пулпа. Во групата на здрави пулпи нашле присуство на ретки Т и/или Б лимфоцити, при што постоела лесна преминација на *CD8 (cytotoxic/suppressor)* Т лимфоцити. Во групата со реверзибилно оштетена пулпа, повеќе од 90% од лимфоцитната популација биле Т лимфоцити, со *CD4/CD8* однос од 0.56. Во групата со иреверзибилно оштетена пулпа овој однос бил 1.14, во корист на *CD4* позитивните лимфоцити.

Слична студија направиле Gregoire и сор. (1990), кои ја изучувале имунолошката реакција на клетките кај здрави и воспалени дентални пулпи. Од анализата на резултатите извлекле два главни заклучока: прво, дека во здравите примероци од пулпино ткиво постоела преференцијална локализација на лимфоцитите на периферијата на пулпата, и второ, постоела преминација на субпопулацијата на *CD8 (cytotoxic/suppressor)* лимфоцити и кај здрави и кај воспалени пулпи.

Yoshida и сор. (1996) ја изучувале дистрибуцијата на клетките кои експресирале *class II* антигени, во неформирани, формирани и кариозни човечки заби за да се разјасни кога пулпата стекнува потенцијал за имунолошка одбрана и како реагира на дентален кариес. Во пулпите кај нееруптираните заби во развој, биле дистрибуирани бројни *HLA-DR* позитивни клетки, главно во и околу одонтоблстниот слој. Кај еруптираните заби тие биле лоцирани главно под одонтобласниот слој. Кај површните кариозни лезии тие се агрегирале под кариозната лезија, додека кај подлабоките кариозни лезии, агрегацијата на овие клетки го зафатила и одонтобласниот слој. Овие клетки биле забележани и по должината на пулподентинската граница, при што цитоплазматските продолженија навлегувале длабоко во дентинските тубули каде биле сместени заедно со одонтобласните продолженија. Авторите заклучуваат дека хуманата дентална пулпа е опремена со потенцијал за имунолошка одбрана уште пред забите да еруптираат. Во почетниот стадиум на кариозна инфекција, имунолошкиот одговор е забрзан со помош на клетките кои експресираат класа *II* на антигени, додека *HLA-DR* позитивните клетки со прогресијата на кариозната лезија, навлегуваат се подлабоко во дентинските тубули.

До слични резултати дошле и Izumi и сор. (1996) кои нашле дека бројот на *HLA-DR* позитивни клетки и макрофаги се зголемува со прогресијата на кариозната лезија, со што тие партиципираат во создавањето на ефикасен имунолошки одговор, но истовремено и во механизмите за заштита на ткивото на пулпата (бидејќи макрофагите ги фагоцитираат протеазите ослободени од инфламаторните клетки, штетните микроорганизми, како и оштетените ткивни резидуи).

Kamal и сор. (1997) во студија на експериментално предизвикан кариес кај стаорци, ја испитувале кинетиката на пулпините *Ia* антиген-

презентиращки клетки и макрофаги. Резултатите од испитувањето биле корелирани со количината на формирање на репараторен дентин. Резултатите покажале дека иницијалниот одговор на пулпата се карактеризира со локализирана акумулација на *Ia* антиген презентирачки клетки под дентинските тубули, кои комуницираат со површниот кариес. Притоа, најдено е прогресивно зголемување на нивниот број во зависност од длабочината на кариозната лезија. Најголема концентрација на овие клетки е најдена кога кариесот се проширил и во репараторниот дентин. Авторите заклучиле дека зголеменото присуство на *Ia* антиген-презентиращки клетки ја започнува одбранбената реакција на пулпата.

Izumi и сор. (1995) ги испитувале промените во пулпата според длабочината на кариозната лезија. Состојбата на пулпиното ткиво ја класифицирале во седум групи, при што нашле прогресивно зголемување на бројот на имунокомпетентни клетки кај групите со напреднат стадиум на кариес. Имунолошката реакција на пулпата тие ја класифицирале како рана и напредната. Во раната фаза целуларниот имунолошки одговор бил претставен со присуството на клетки од Т лимфоцитната лоза, додека во напреднатата фаза преминал хуморалниот имун одговор, претставен од клетките на Б лимфоцитната лоза. Авторите заклучуваат дека пулпата е добро опремена со функционален имунолошки одговор што е доволен како биолошки одбранбен механизам.

Одбранбените механизми на пулподентинскиот комплекс се состојат од спектар на биолошки системи, во кои имунокомпетентните клетки, нервниот систем и крвоснабдувањето имаат значајна улога.

Okiji и сор. (1996, 1997 b) со помош на имунохистохемиска техника, двојно имунофлуоресцентно бојење и ласерската конфокална скенирачка микроскопија (CLSM), ги испитувале пулпините акцесорни клетки кај глумци, во однос на нивната структурна поврзаност со нервите и засегнатоста на нивните функционални капацитети, од страна на неуропептидите. Испитувањата покажале дека постои близок контакт помеѓу тенките нервни влакна и имунокомпетентните клетки, при што тие најчесто биле забележани во пара-одонтобласниот регион на коронарната пулпа каде повеќе од 70% на *Class II* антиген презентирачки клетки биле многу блиску лоцирани до нервните влакна. Меѓутоа, макрофагите во многу помал број биле лоцирани во близина на нервните влакна. Податоците добиени од овие доста сложени испитувања покажале дека пулпините сензорни нервни влакна и нивните продукти можат да имаат влијание на имунолошката одбрана во денталната пулпа.

3. МОТИВ ЗА ИЗРАБОТКА НА ТЕЗАТА

МОТИВОТ за изработка на тезата е да се проучи каква е способноста на пулпиното ткиво да продуцира хуморален и целуларен имунолошки одговор претставен преку имунокомпетентните клетки, во зависност од длабочината на кариозната лезија. Понатаму, колку и кои имунокомпетентни клетки ја инфилтрираат пулпата во асоцијација со развојот на кариозната лезија и кое е нивното значење за патогенезата на денталниот кариес, посебно од гледна точка на конзервативниот третман на болестите на тврдите забни супстанции и пулпата.

Треба да се нагласи дека во литературата постои релативно мал број на трудови во кои е испитуван соодносот помеѓу квалитетот и квантитетот на одбранбената реакција на имунокомпетентните клетки во пулпата и длабочината на кариозната лезија.

4. ЦЕЛИ НА ТЕЗАТА

Поаѓајќи од потребата за што подобро и посуптилно проучување, а со тоа и проширување на сознанијата за одбранбените можности на пулпата (базична проблематика во клиничката стоматолошка пракса), си поставивме за цел :

1. Со помош на хистопатолошка анализа на пулпиното ткиво да се добијат додатни, нови сознанија за *јачинаџа на пулпиниоџи клеџочен одџвор во зависноџи од ипрогресијаџа на кариознаџа лезија*.
2. Да се согледаат промените во *бројоџи на имунокомџеџенџни клеџки* кои се јавуваат во пулпиното ткиво, во *различниџе сџадиуми на развојоџи на кариознаџа лезија* (квантитативна евалуација).
3. Да се согледаат промените во *џиџоџи на имунокомџеџенџни клеџки* кои се јавуваат во пулпиното ткиво, при *различниџе сџадиуми од развојоџи на кариознаџа лезија* (квалитативна евалуација).
4. Да се добие одговор на прашањето: При која *длабочина* на кариозната лезија се јавуваат иреверзибилни промени во пулпата и во зависност од тоа,
5. Во кој *сџадиум* најдоцна треба да биде превземен третман на забот за да не настанат иреверзибилни промени во пулпата.

5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Испитувањата се направени на пулпното ткиво од 30 интактни и 120 заби со различен степен на прогресија на кариозната лезија, екстрахирани на Клиниката за детска и превентивна стоматологија при ЈЗО “Стоматолошки клинички центар”. Забите се добиени од здрави деца на возраст од 9 до 14 години, од кои 79 (52.7%) се од машки пол, а 71 (47.3%) од женскиот пол.

Екстракцијата беше извршена поради ортодонтски или други причини, под инфилтративна, односно општа анестезија. Веднаш по екстракцијата, секој заб е расечен надолжно со сепарир шајбна под млаз вода и раздвоен на два дела со помош на пластичен инструмент, а забната пулпа беше екскавирана во целост, според препораките на *Bjorndal и Thylstrup (1994)*.

Длабочината на кариозната лезија беше одредувана во однос на границите на дисколорација, според препораките на *Fusayama и сор.(1966)* Тие укажуваат на фактот дека на деминерализацијата на дентинот, секогаш му претходи негова дисколорација. Пенетрација на микроорганизми никогаш не била забележана под зоната на дисколорација, па затоа е одлучено одредувањето на длабочината на кариозната лезија да се врши според границата на дисколорација.

Забите, во зависност од длабочината на кариозната лезија, се поделени во пет групи и тоа:

- *Група 1* - здрави заби
- *Група 2* - заби со *caries superficialis*
- *Група 3* - заби со *caries media*
- *Група 4* - заби со *caries profunda*
- *Група 5* - пулпни

Првата група опфаќа заби без кариес, а воедно претставува и контролна група во студијата.

Втората група (заби со *caries superficialis*), ги опфаќа забите во кои кариозната лезија се наоѓа во емајлот.

Третата група (заби со *caries media*) ги опфаќа забите кај кои кариозната лезија се наоѓа помеѓу емај-дентинската граница и една третина од дебелината на примарниот дентин, што одговара на 2-3 мм. оддалеченост од пулпината комора.

Четвртата група (заби со *caries profunda*), ги опфаќа забите кај кои кариозната лезија надминува две третини од дебелината на

примарниот дентин, односно од 0,5 до 1,5 мм. оддалеченост од пулпината комора.

Пешајата група ги опфаќа забите со експонирана пулпа (*pulpiti*).

Пулпините ткива беа анализирани во Лабораторијата за хистопатологија и клиничка цитологија на Институтот за радиотерапија и онкологија при ЈЗО “Клинички центар” - Скопје.

5.1. КЛИНИЧКИ ИСПИТУВАЊА

За поставување точна клиничка дијагноза за степенот на напреднатоста на кариозната лезија беше употребен следниов стандардизиран прашалник:

ПРАШАЛНИК			
Реден број _____			
Име _____	Презиме _____		
Пол _____	Старост _____		
Место на живеење _____	Број на картон _____		
Датум на екстракција на забот _____			
Причина за екстракција на забот:			
1. <i>орјодониска</i>	2. <i>деструкција на коронка</i>		
3. <i>макродонција</i>	4. <i>прекубројни заби</i>		
5. <i>воспаление</i>	6. <i>травма</i>		
7. <i>несоработка на пациентот</i>			
Вид на заб:			
1. <i>инцизив</i>	2. <i>канин</i>	3. <i>премолар</i>	4. <i>молар</i>
Клиничка дијагноза:			
1. <i>здрав</i>			
2. <i>Caries superficialis</i>			
3. <i>Caries media</i>			
4. <i>Caries profunda</i>			
5. <i>Pulpitis</i>			
Макроскопски опис на забот пред негово пресекување			
1. <i>здрав</i>			
2. <i>кариес во емајл</i>			
3. <i>кариес во денџин</i>			
4. <i>кариес длабоко во денџин</i>			
5. <i>експонирана пулпа</i>			
Макроскопски опис после пресекување на забот			
1. <i>здрав</i>			
2. <i>кариес до емајл-денџинска граница (caries superficialis)</i>			
3. <i>кариес во денџин - до 1/3 од дебелина на примарниот денџин (2 - 3 мм. оддалеченост од пулпината комора)</i>			
4. <i>кариес длабоко во денџин - надминува 2/3 од дебелина на примарниот денџин (0,5 - 1,5 мм. оддалеченост од пулпината комора)</i>			
5. <i>експонирана пулпа</i>			

5.2. СВЕТЛОСНО-МИКРОСКОПСКИ ИСПИТУВАЊА

Добиените пулпи веднаш беа фиксирани во 10% формалин за време од 24 часа, а потоа обработени во специјален апарат (Хистотехникон од типот *Shandon*) со растечки концентрации на алкохол (од 70 до 100%), дехидрирани во *Xylo* и вклопени во парафински блокови (парафинот е со точка на топење 56°C).

Од секоја пулпа беа направени по 7 ткивни пресеци, од кои едниот веднаш беше обоен со стандарно лабораториско боење *H&E* (*Хемајоксилин-Еозин*) поради морфолошка проценка на пулпното ткиво и одредување јачината на пулпиниот имунолошки одговор.

На секој од преостанатите 6 пресеци беше направена имунохистохемиска анализа со помош на *avidin-biotin ABC/horseredish peroxidase* методот (види шема бр. 3).¹⁴⁹

За да се стекне увид во морфологијата на пулпното ткиво и да се одреди јачината на пулпиниот имунолошки одговор, истражувањето беше насочено кон одредувањето на клеточните елементи во пулпата, со посебен акцент на присуството, односно отсуството на воспалителни клетки во пулпината строма. Од воспалителните клетки на пулпата, во испитувањето се опфатени: *Лимфоцити*, *Неутропофилни леукоцити*, *гранулоцити*, и *Плазма клетки*.

Лимфоцитите под светлосен микроскоп имаат тркалезна форма без дендритични продолжоци, и униформно хиперхроматско јадро, и тие се лоцирани во пулпината строма. За разлика од нив, неутрофилните леукоцити-гранулоцити поседуваат сегментирани хиперхроматски јадра и скудна еозинофилна цитоплазма.

Плазма клетките пак, се гледаат како клетки со средна големина, со дистрибуција на хроматин во јадрото како на "тркало од кола", и еозинофилна цитоплазма.

Присуството на воспалителните клетки и нивниот број ја одредуваат состојбата на пулпното ткиво, како и интензитетот на воспалителниот, односно имунолошкиот одговор.

5.3. ИМУНОХИСТОХЕМИСКИ ИСПИТУВАЊА

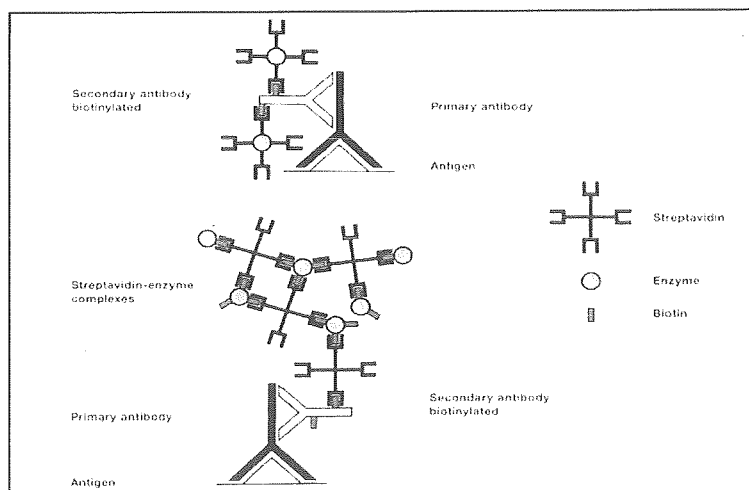
За да се стекне увид во квалитетот и квантитетот на пулпиниот имунолошки одговор, како индикатор на нејзината одбранбена функција, направени се имунохистохемиски испитувања на пулпното ткиво со аплицирање на следниве моноклонални антители:

1. **UCHL-1** - пан Т клеточен маркер, со кој се идентифицираат сите Т клетки;
2. **CD4** - маркер за идентификација на *helper/inducer* Т клетките;

3. **CD8** - маркер за идентификација на *cytotoxic/suppressor* Т клетките;
4. **CD20** - маркер за идентификација на Б лимфоцити;
5. **CD68** - маркер за макрофагна диференцијација;
6. **HLA-DR** - маркер за дендритичните клетки

Процедурата на имунохистохемиската анализа се состои од следниве постапки:

1. депарафинизирање и хидрирање на ткивните пресеци со ксилол и намалувачки концентрации на алкохол;
2. блокирање на ендегената пероксидазна активност со 0.3% водороден пероксид (H_2O_2) растворен во метанол, за време од 30 минути;
3. инкубирање на пресеците со разреден, нормален, блокирачки серум, за време од 20 минути;
4. инкубирање на пресеците со примарни антитела, разредени во соодветни концентрации, за време од 30 минути (користени се комерцијално достапни антитела од фирмата *VECTOR Laboratories, Burlingame, CA, USA*);
5. инкубирање на пресеците со секундарно антитело, обележано со биотин, за време од 30 минути (*horse biotinylated antibody*);
6. инкубирање на пресеците со *VECTASTAIN Elite[®] ABC* реагенс, за време од 30 минути (*Avidin and Biotinylated horseredish peroxidase macromolecular Complex - ABC technique*; види шема бр. 3)
7. инкубирање на пресеците со раствор на пероксидазен супстрат, за време од 2 до 10 минути (3'.3' Диаминобезидин - *DAB*);
8. на пресеците се прави контраобојување со хематоксилин, се просветлуваат во алкохол и ксилол и се покриваат со покровен медиум.



Шема бр. 3 Приказ на имунопероксидазнајна техника

Помеѓу секоја поединечна постапка (од 1 до 8), ткивните пресеци се промиваат по 5 минути во *PBS (Phosphate Buffered Saline, PH=7.4)*. Во

секоја серија на боене беа употребени позитивни и негативни контроли за секое поединечно антители, а со цел да се процени точноста на позитивната, односно негативната реакција.

Позитивната реакција претставува кафеавкаво-црвенкав продукт, локализиран на местото на реакцијата на примарното антители со соодветниот антиген. Бројот на позитивни имунокомпетентни клетки беше одреден на семиквантитативен начин, под светлосен микроскоп (BH2, OLIMPUS), на зголемување од 200 пати ($\times 200$).

Резултатите од испитувањата се верификуваат со микрофотографии.

Во статистичката обработка на добиените резултати од истражувањето беа користени дескриптивни и аналитички методи. За опис на добиените резултати беа користени следните параметриски и непараметриски дескриптивни статистички методи:

- аритметичка средина;
- стандардна девијација;
- стандардна грешка;
- минимум;
- максимум;
- медијана;
- фреквенци;
- проценти;
- кросџабулации

За тестирање на нултата хипотеза и добивање на валидни статистички заклучоци, во зависност од типот на податоците и од нивната распределба, беа користени следниве параметриски и непараметриски аналитички статистички методи:

1. еднофакторска анализа на варијанса за нумерички податоци (*One way ANOVA*) со тест на квадрат на најмала разлика (*LSD*-тест) за тестирање на меѓугрупните разлики;
2. еднофакторска анализа на варијанса за рангови по Крускал-Валис (*Kruskal-Wallis* - тест) со Ман-Витниев У тест на инверзија за меѓугрупни разлики (*Mann - Whitney U* тест);

Сите резултати се добиени компјутерски со помош на статистички пакет од Центарот за информатика при Клиничкиот центар на Медицинскиот факултет во Скопје.

Нивоата на веројатност за нултата хипотеза согласно со меѓународните стандарди за биомедицински науки се $p < 0.05$ и $p < 0.01$.

Резултатите од статистичките анализи се прикажани компјутерски со помош на табели и графикони.

6. РЕЗУЛТАТИ

6.1. РЕЗУЛТАТИ ОД КЛИНИЧКИТЕ ИСПИТУВАЊА

На табела бр. 4 се прикажани причините за екстракција на забите употребени во испитувањето. Најголем број, 127 (84.6%) заби беа екстрахирани од ортодонтски причини, 6 (0.40%) се екстрахирани поради воспаление, по 4 заби (0.26%) се екстрахирани поради деструирана коронка, под општа анестезија и поради несоработка на пациентот, 3 заби (0.20%) се екстрахирани како прекубројни, додека 2 (0.13%) заба беа екстрахирани поради атипична поставеност.

Табела бр. 4 Причини за екстракција на заби

Причина за екстракција на забот	Број	(%)
Ортодониска причина	127	(84.6%)
Воспаление	6	(0.40%)
Деструирана коронка	4	(0.26%)
Под општа анестезија	4	(0.26%)
Несоработка со пациентот	4	(0.26%)
Прекубројни заби	3	(0.20%)
Атипично поставени заби	2	(0.13%)
Вкупно	150	(100.0%)

На табела бр. 5 е дадена дистрибуцијата на испитуваните заби според групата на која и припаѓаат. Најчесто беа користени премолари, 86 (57.3%), потоа следуваат моларите со 53 (35.3%), па инцизивите со 7 (0.70%) и само 4 (0.26%) од испитуваните заби се канини.

Табела бр. 5 Дистрибуција на анализирани заби според видот на забот

Вид на заб	Број	%
Инцизив	7	0.70
Канин	4	0.26
Премолар	86	57.3
Молар	53	35.3
Вкупно	150	100.0

На табела бр. 6 е даден макроскопскиот опис на забите пред пресекување на забот. Можеме да видиме, дека кај сите анализирани групи имаме подеднаков број на заби, односно по 30 (20.0%) заби во секоја група.

Табела бр. 6 Макроскопски опис на анализираниите заби пред пресекување на забот

Макроскопски опис пред пресекување на забот	Број	%
<i>Здрав заб</i>	30	20.0
<i>Кариес во емајл</i>	30	20.0
<i>Кариес во денџин</i>	30	20.0
<i>Кариес, длабоко во денџин</i>	30	20.0
<i>Ексфолирана пулпа</i>	30	20.0
<i>Вкупно</i>	150	100.0

На табела бр. 7 е даден макроскопскиот опис на забите после пресекување на забот. Може да се види, дека кај сите анализирани групи имаме подеднаков број на заби, односно по 30 (20.0%) заби во секоја испитувана група.

Табела бр. 7 Макроскопски опис на анализираниите заби после пресекување на забот

Макроскопски опис после пресекување на забот	Број	%
<i>Здрав заб</i>	30	20.0
<i>Кариес до емај-денџинска граница</i>	30	20.0
<i>Кариес во денџин (2 - 3. мм оддалеченост од пулпата)</i>	30	20.0
<i>Кариес длабоко во денџин (0.5-1.5 мм. оддалеченост од пулпата)</i>	30	20.0
<i>Ексфолирана пулпа</i>	30	20.0
<i>Вкупно</i>	150	100.0

6.2. РЕЗУЛТАТИ ОД СВЕТЛОСНО-МИКРОСКОПСКИТЕ ИСПИТУВАЊА

Испитуваните пулпи беа анализирани хистолошки (хематоксилин-еозинско бојење), во сериски пет микронски пресеци, на светлосен микроскоп.

Светлосно микроскопските испитувања на пулпите кои потекнуваат од здрави заби покажуваат дека одонтбластите имаат нормален палисиден распоред, фибробластите се со вретенест изглед,

еозинофилна цитоплазма и јадро со јасна нуклеарна мембрана. Хроматинот се бои темно сино и е дисперзиран како нежна мрежа. Колагените влакна се отсутни или минимално присутни. Крвните садови се со нормална големина, а нервните влакна со вообичаен изглед. Многу ретко се забележуваат поединечни лимфоцити, лоцирани во коронарниот дел од пулпата.

Кај *caries superficialis*, во делот на пулпата кој е во проекција со лезијата, постои блага вознемиреност и лесна редукција на одонтобласниот слој, со благо пореметена организација во распоредот на клетките. Фибробластите се со вретенест изглед и лесно ирегуларна нуклеарна мембрана. Крвните садови благо се дилатирани. Бројот на лимфоцитите лесно е зголемен. Тие се лоцирани во коронарниот дел на пулпата, во регијата која одговара на кариозната лезија.

Кај забите со *caries media*, во пределот на пулпата каде завршуваат зафатените дентински тубули се забележува лесна акумулација на лимфоцити. Почетни дегенеративни промени се забележуваат на фибробластите, како и стеснување на “Weill-та зона”. Крвните садови под кариозната лезија се лесно дилатирани и исполнети со еритроцити, а присутна е и почетна фиброза.

Кај забите со *caries profunda*, во пулпата е присутна нагласена инфламаторна компонента, претставена со акумулации на клеточен инфилтрат кој е составен во најголем дел од лимфоцити, макрофаги, плазма клетки и помал број гранулоцити. Крвните садови се силно дилатирани и исполнети со еритроцити, при што поедини еритроцити се среќаваат и надвор од васкуларните корита. Ова оди во прилог на фактот дека постојат дефекти во нивната базална мембрана. Фокално постојат области на фиброза (ако кариозниот процес трае подолго), како и дистрофично-дегенеративни промени на пулпината строма со појава на вакуолна дегенерација на фибробластите.

Кај воспалителните состојби на пулпата - *pulpiti*, во регијата на воспалението не постои одонтобласниот слој, а на негово место пролиферира младо гранулационо ткиво составено од голем број на млади капиларни крвни садови, како и зголемен број на фибробласти и фибрили. Воспалителните клетки (лимфоцити, макрофаги, гранулоцити, како и плазма клетки) се дифузно распоредени и се присутни во многу голем број. Во голем број од случаите се формираат апсцесни шуплини, што се опкружени со дебели колагени влакна. Во некои случаи може да се видат области на коагулациона, односно коликвациона некроза на пулпата или формирање на пулпин полип кој е составен од пролиферирано младо гранулационо ткиво богато со крвни капилари и нервни завршоци. Пролиферираното гранулационо ткиво преку комуникацијата излегува од пулпината комора и ја исполнува кариозната лезија.

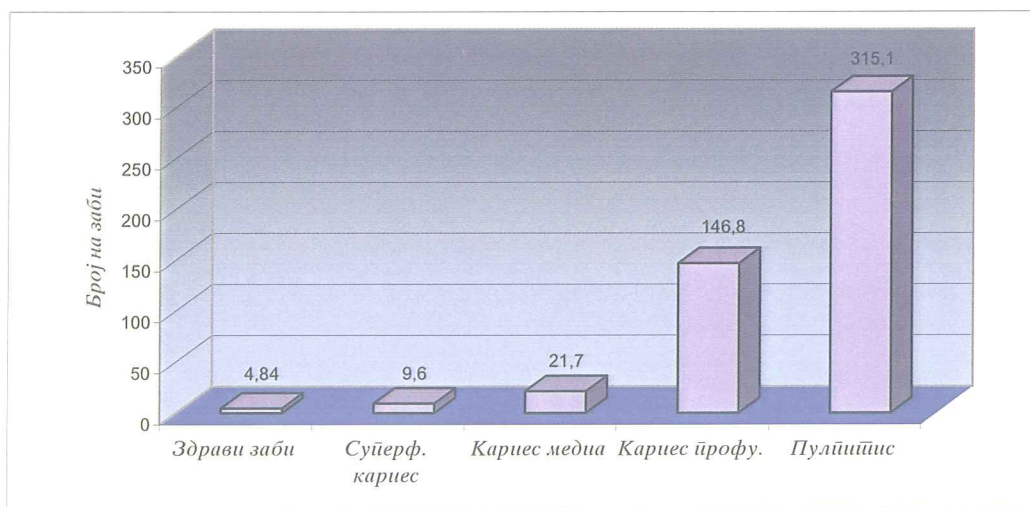
Дистрибуцијата на лимфоцитите е презентирана на табела бр. 8

Кај здравите заби неколку лимфоцити се распоредени во коронарниот дел на пулпата (4.84 ± 1.51). Нивниот број незначително е зголемен кај *caries superficialis* (9.60 ± 2.39), а кај *caries media* бројот значително се зголемува и изнесува 21.70 ± 11.05 . Кај *caries profunda* бројот на лимфоцитите е уште поголем достигнувајќи ги вредностите од 146.80 ± 8.97 , а кај *pulpitis* среќаваме енормно зголемување што изнесува 315.10 ± 12.74 . Разликата во бројот на лимфоцитите е сигнификантна ($p < 0.05$) помеѓу пулпите од здрави заби и заби со *caries superficialis*, а висока статистичка сигнификантност ($p < 0.01$) постои помеѓу сите други испитувани групи.

Табела бр. 8 Број на лимфоцити во хумана денитална пулпа од здрави заби и заби со различен степен на кариес

Клиничка дијагноза	Средна вредност	Стандард. девијација	Стандард. грешка	Мин.	Макс.	Медиана	Варијанса	Вкупен број
здрави заби	4.84	1.51	0.27	2.50	7.90	4.85	2.30	30
<i>caries superficialis</i>	9.60	2.39	0.43	7.60	11.50	9.70	5.73	30
<i>caries media</i>	21.70	11.05	2.01	17.60	24.90	21.20	14.32	30
<i>caries profunda</i>	146.80	8.97	1.63	126.50	165.20	145.60	80.62	30
<i>pulpitis</i>	315.10	12.74	2.32	278.40	336.10	312.90	162.48	30
Вкупно	99.60	53.17	4.34	2.50	336.10	133.20	2828.09	150

Графичкиот приказ на резултатите од анализата на лимфоцитите се прикажани и на графикон бр. 1



Графикон бр. 1 Среден број на лимфоцити во хумана денитална пулпа од здрави заби и заби со различен степен на кариес

На *табела бр. 9* е прикажана дистрибуцијата на **гранулоцитите**. Овие клетки не се најдени кај здрави заби и заби со *caries superficialis*. Кај *caries media* бројот на гранулоцитите изнесува 1.80 ± 0.56 . Веќе кај *caries profunda* наоѓаме значително зголемување (20.93 ± 3.38), а кај отворената пулпа (*pulpitis*) нивниот број уште повеќе се зголемува и изнесува 57.04 ± 6.13 .

Разликата во бројот на гранулоцитите помеѓу групата на здрави заби и заби со *caries superficialis* не е статистички значајна. Статистички сигнификантна разлика ($p < 0.05$) е установена помеѓу *caries superficialis* и *caries media*, а висока статистичка сигнификантност ($p < 0.01$) е установена помеѓу сите други испитувани групи.

Табела бр. 9 Број на **гранулоцити** во хумана денитална пулпа од здрави заби и заби со различен степен на кариес

Клиничка дијагноза	Средна вредност	Стандард. девијација	Стандард. грешка	Мин.	Макс.	Медиана	Варијанса	Вкупен број
здрави заби	0	0	0	0	0	0	0	30
<i>caries superficialis</i>	0	0	0	0	0	0	0	30
<i>caries media</i>	1.80	0.56	0.10	0.50	2.70	1.90	0.31	30
<i>caries profunda</i>	20.93	3.38	0.61	14.60	26.59	20.40	11.43	30
<i>pulpitis</i>	57.04	6.13	1.12	44.60	68.50	57.70	37.69	30
Вкупно	15.95	22.15	1.80	0	68.50	3.15	490.67	150

Резултатите од анализата на гранулоцитите графички се прикажани на *графикон бр. 2*



Графикон бр. 2 Среден број на **гранулоцити** во хумана денитална пулпа од здрави заби и заби со различен степен на кариес

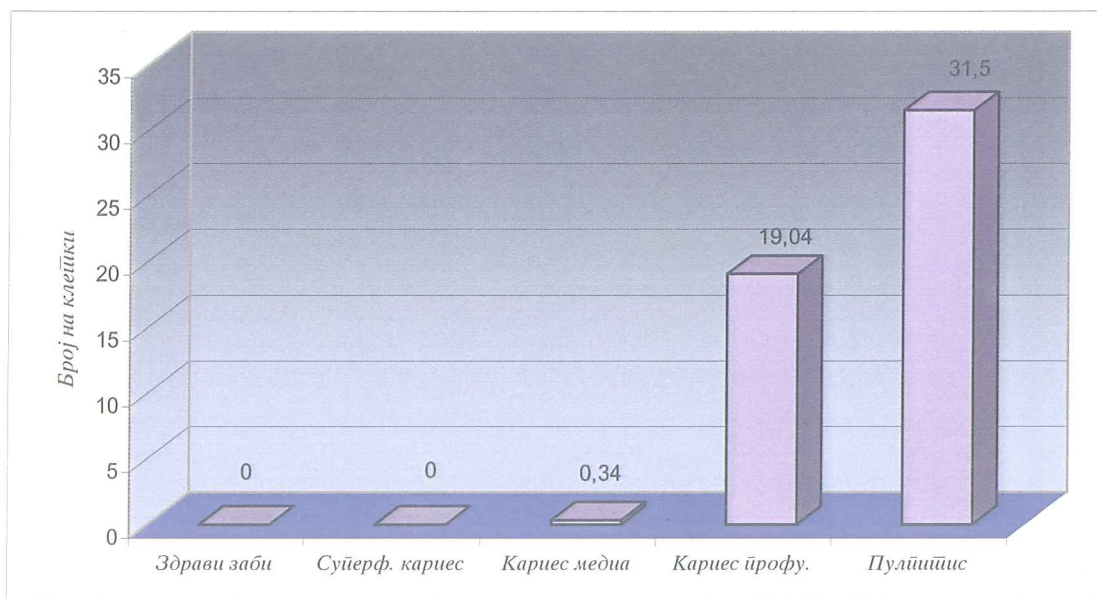
Дистрибуцијата на плазма клетките е дадена на табела бр. 10. Овие клетки не се детектирани во групата на здрави заби и заби со *caries superficialis*. Кај *caries media* нивниот број е многу мал и изнесува 0.34 ± 0.55 . Кај *caries profunda* бројот значително се зголемува (19.04 ± 3.77), за да кај експонираната пулпа (*pulpitis*), уште повеќе се зголеми и изнесува 31.50 ± 3.70 .

Статистички сигнификантна разлика не е утврдена помеѓу здравите заби и *caries superficialis* и помеѓу *caries superficialis* и *caries media*. Помеѓу сите други испитувани групи постои висока статистичка сигнификантност ($p < 0.01$).

Табела бр. 10 Број на плазма клетки во хумана денитална пулпа од здрави заби и заби со различен степен на кариес

Клиничка дијагноза	Средна вредност	Стандард. девијација	Стандард. грешка	Мин.	Макс.	Медиана	Варијанса	Вкупен број
здрави заби	0	0	0	0	0	0	0	30
<i>caries superficialis</i>	0	0	0	0	0	0	0	30
<i>caries media</i>	0.34	0.55	0.10	0.10	1.60	0.0	0.31	30
<i>caries profunda</i>	19.04	3.77	0.68	10.60	24.60	19.40	14.23	30
<i>pulpitis</i>	31.50	3.70	0.67	27.40	36.20	30.50	13.75	30
Вкупно	10.17	9.67	0.78	0	36.20	4.60	93.53	150

Резултатите од анализата на плазма клетките графички се прикажани на графикон бр. 3



Графикон бр. 3 Среден број на плазма клетки во хумана денитална пулпа од здрави заби и заби со различен степен на кариес

5.3 РЕЗУЛТАТИ ОД ИМУНОХИСТОХЕМИСКИТЕ ИСПИТУВАЊА

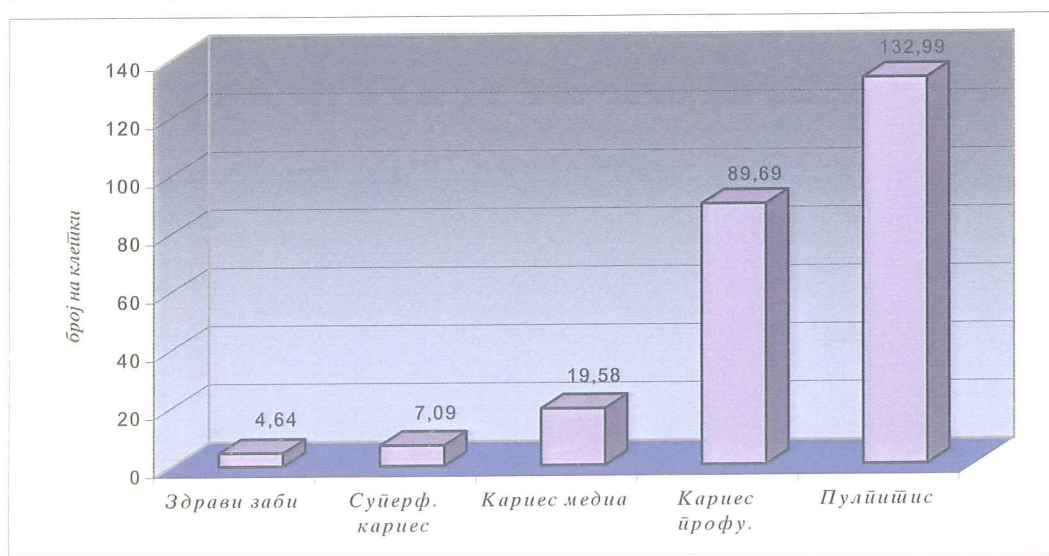
5.3.1. Дистрибуција на Т лимфоцити

Дистрибуцијата на Т лимфоцитите е дадена на *табела бр 11*. Т лимфоцитите беа регистрирани во сите испитани примероци од пулпиното ткиво. Карактеристичен наод е дека Т лимфоцитите кај здравите заби се побројни во коронарниот отколку во радикуларниот дел на пулпата (средно 4.64 ± 1.59). Нивниот број благо расте кај *caries superficialis* (7.09 ± 2.34), како и кај *caries media* (19.58 ± 11.14), додека кај *caries profunda* нагло се зголемува (89.69 ± 12.68). Бројот на Т лимфоцити е најголем кај *pulpitis* (132.99 ± 8.58). Високи статистички сигнификантни разлики се установија помеѓу сите испитувани групи ($p < 0.01$).

Табела бр. 11 Број на Т лимфоцити во хумана денитална пулпа од здрави заби и заби со различен степен на кариес

Клиничка дијагноза	Средна вредност	Стандард. девијација	Стандард. грешка	Мин.	Макс.	Медиана	Варијанса	Вкупен број
здрави заби	4.64	1.59	0.29	2.30	7.80	4.60	2.54	30
<i>caries superficialis</i>	7.09	2.34	0.42	4.80	10.50	6.50	3.14	30
<i>caries media</i>	19.58	11.14	2.03	8.60	21.20	18.50	5.47	30
<i>caries profunda</i>	89.69	12.68	2.31	78.20	113.80	92.25	124.16	30
<i>pulpitis</i>	132.99	8.58	1.56	118.20	151.60	132.35	73.69	30
Вкупно	50.79	52.38	4.27	2.30	151.60	90.30	2744.15	150

Резултатите од анализата на Т лимфоцитите графички се прикажани на *графикон бр. 4*



Графикон бр. 4 Среден број на Т лимфоцити во хумана денитална пулпа од здрави заби и заби со различен степен на кариес

5.3.3. Дистрибуција на T_s (CD8) лимфоцитите

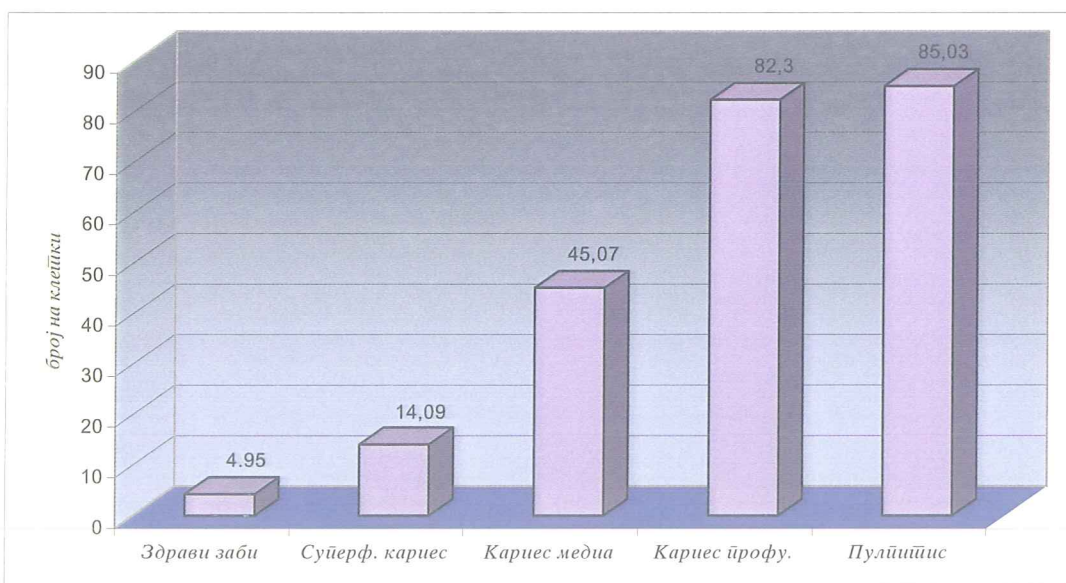
На табела бр. 13 е прикажана дистрибуцијата на супресорните (CD8 позитивни) лимфоцити. Тие беа присутни во мал број кај здравите пулпи (4.95±1.2), а нивниот број лесно се зголемува кај *caries superficialis* (14.09±1.79). Бројот на клетките значително се зголемува кај *caries media* (45.07±4.34), *caries profunda* (82.30±6.16) и кај *pulpitis* (85.03±10.94).

Супресорните (CD8 позитивни) Т лимфоцити покажаа висока статистичка сигнификантност ($p < 0.01$) помеѓу сите испитувани групи, освен помеѓу *caries profunda* и *pulpitis* каде има статистички значајна разлика ($p < 0.05$).

Табела бр. 13 Број на CD8 лимфоцити во хуманата денитална пулпа од здрави заби и заби со различен степен на кариес

Клиничка дијагноза	Средна вредност	Стандард. девијација	Стандард. грешка	Мин.	Макс.	Медиана	Варијанса	Вкупен број
здрави заби	4.95	1.20	0.22	2.20	6.40	4.35	1.45	30
<i>caries superficialis</i>	14.09	1.79	0.32	11.30	19.50	14.20	3.23	30
<i>caries media</i>	45.07	4.34	0.70	28.90	56.40	44.30	18.92	30
<i>caries profunda</i>	82.30	6.16	1.10	69.30	86.50	83.00	119.83	30
<i>pulpitis</i>	85.03	10.94	1.90	69.50	97.40	83.90	139.80	30
Вкупно	46.15	22.80	1.80	2.20	97.40	46.60	520.00	150

Резултатите од анализата на CD8 лимфоцитите графички се прикажани на графикон бр. 6



Графикон бр. 6 Среден број на CD8 лимфоцити во хумана денитална пулпа од здрави заби и заби со различен степен на кариес

5.3.4. Однос помеѓу T_H/T_S (CD4/CD8) лимфоцити

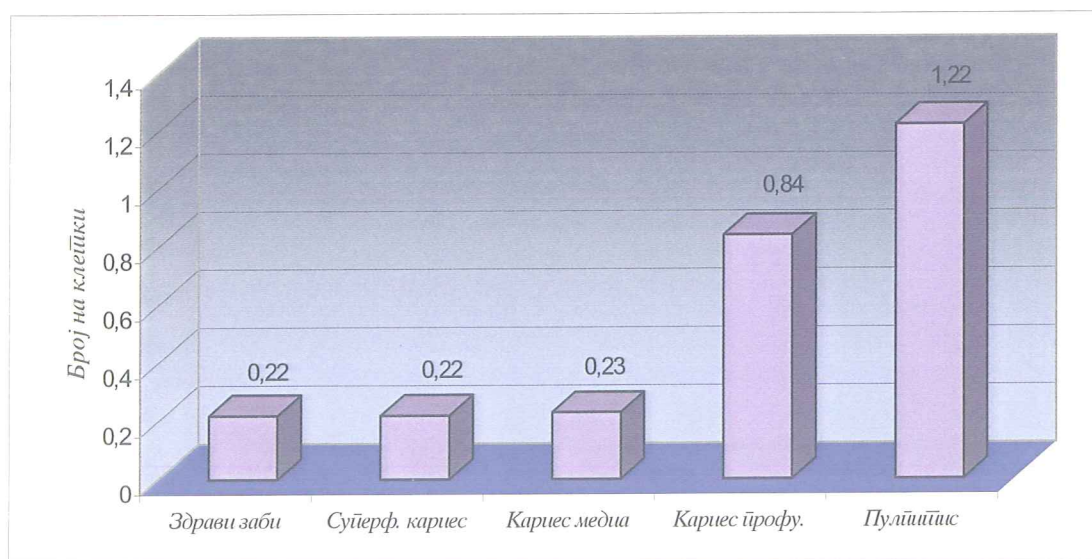
На табела бр. 14 е прикажан односот помеѓу хелперните (CD4) и супресорните (CD8) лимфоцити. Кај пулпите од здрави заби изнесува 0.22, кај *caries superficialis* и *caries media* изнесува 0.22, односно 0.23. Односот помеѓу клетките нагло се зголемува кај пулпите од заби зафатени со *caries profunda* - 0.84 и кај *pulpitis* - 1.22.

Статистички сигнификантна разлика не најдовме помеѓу здрави и *caries superficialis* и помеѓу *caries superficialis* и *caries media*. Помеѓу сите преостанати групи утврдивме висока статистичка сигнификантност ($p < 0.01$).

Табела бр. 14 Однос на CD4 и CD8 лимфоцити во хумана денитална пулпа од здрави заби и заби со различен степен на кариес

Клиничка дијагноза	Средна вредност	Стандард. девијација	Стандард. грешка	Мин	Макс.	Медиана	Варијанса	Вкупен број
здрави заби	0.22	0.23	4.336E-02	0.04	0.95	0.31	5.640E-02	30
<i>caries superficialis</i>	0.22	7.864E-02	1.436E-02	0.09	0.44	0.22	6.184E-03	30
<i>caries media</i>	0.23	5.815E-02	1.062E-02	0.19	0.31	0.22	3.382E-03	30
<i>caries profunda</i>	0.84	0.17	3.279E-02	0.63	0.98	0.83	3.226E-02	30
<i>pulpitis</i>	1.22	0.29	5.407E-02	1.07	1.59	1.25	8.771E-02	30
Вкупно	0.56	0.59	4.833E-02	0.04	1.59	0.38	0.35	150

Резултатите од анализата на односот помеѓу CD4 и CD8 лимфоцитите графички се прикажани на графикон бр. 7.



Графикон бр. 7 Однос помеѓу CD4 и CD8 лимфоцити во хумана денитална пулпа од здрави заби и заби со различен степен на кариес

5.3.6. Однос помеѓу Б и Т лимфоцити

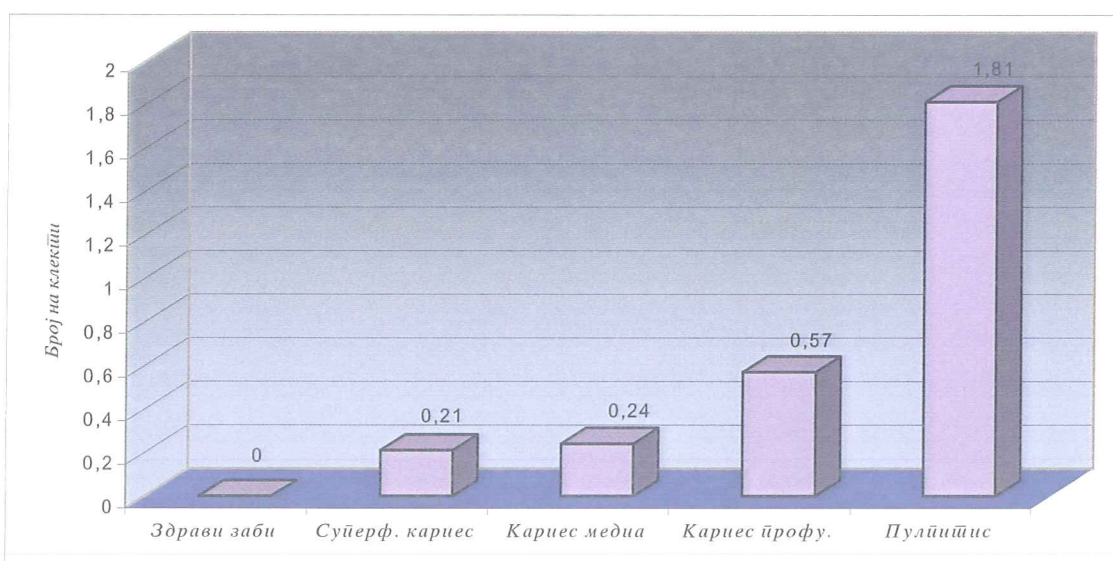
На табела бр. 16 е прикажан односот помеѓу Б и Т лимфоцитите. Кај здравите заби тој изнесува 0 бидејќи кај нив не е идентифицирано присуство на Б клетки. Кај *caries superficialis* и *caries media* овој однос е низок и изнесува $0.21 \pm 5.67E-02$, односно $0.24 \pm 4.97E-02$. Ваквиот однос значително се зголемува кај *caries profunda* каде изнесува $0.57 \pm 8.11E-02$, а кај *pulpitis* е највисок и изнесува 1.81 ± 0.15

Односот помеѓу Б и Т лимфоцитите не е статистички значаен помеѓу *caries superficialis* и *caries media*, додека помеѓу сите други преостанати испитувани групи утврдена е висока статистичка сигнификантност ($p < 0.01$).

Табела бр. 16 Однос помеѓу Б/Т лимфоцитите во хумана денитална пулпа од здрави заби и заби со различен степен на кариес

Клиничка дијагноза	Средна вредност	Стандард. девијација	Стандард. грешка	Мин.	Макс.	Медиана	Варијанса	Вкупен број
здрави заби	0	0	0	0	0	0	0	30
<i>caries superficialis</i>	0.21	5.67E-02	1.036E-02	0.01	0.23	9.00E-02	3.21E-03	30
<i>caries media</i>	0.24	4.97E-02	9.076E-03	0.09	0.27	0.17	2.47E-03	30
<i>caries profunda</i>	0.57	8.11E-02	1.482E-02	0.36	0.66	0.56	6.58E-03	30
<i>pulpitis</i>	1.81	0.15	2.802E-02	1.53	2.13	1.81	2.35E-02	30
Вкупно	0.56	0.68	5.556E-02	0	2.13	0.18	0.46	150

Резултатите од анализата на односот помеѓу Б и Т лимфоцитите графички се прикажани на графикон бр. 9.



Графикон бр. 9 Однос помеѓу Б и Т лимфоцитите во хумана денитална пулпа од здрави заби и заби со различен степен на кариес

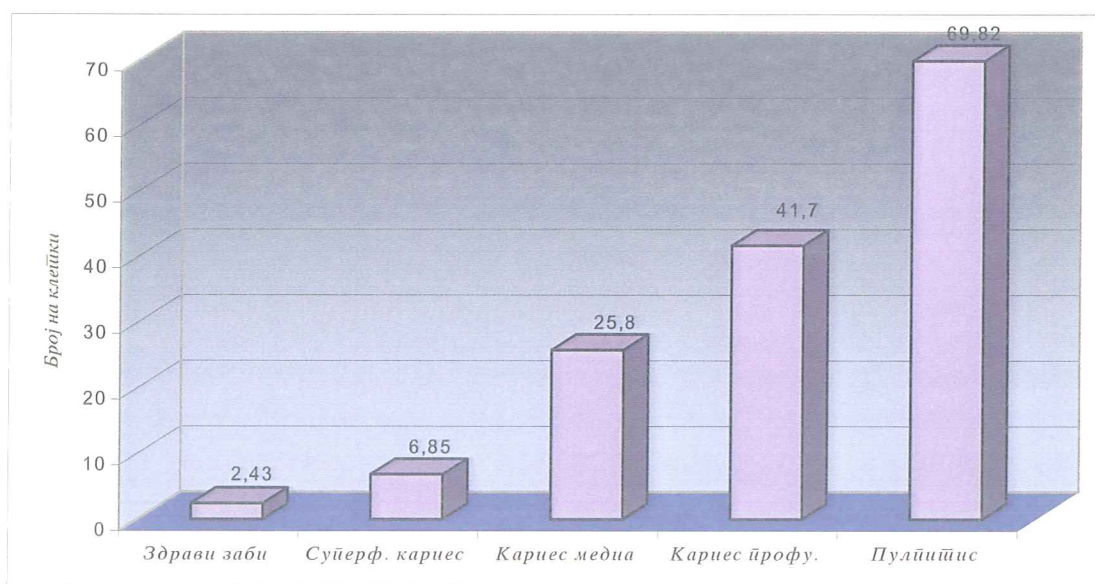
5.3.8. Дистрибуција на макрофаги (CD68)

Макрофагите се лоцирани повеќе централно во пулпиното сврзно ткиво. Тие беа поголеми од другите обоени клетки, а по форма се тркалезни или овални. Нашите резултати покажаа дека овие клетки просечно се застапени со 2.43 ± 1.01 клетки во пулпите од здрави заби. Нивниот број е малку поголем кај *caries superficialis* (6.85 ± 1.67), а значително се зголемува кај *caries media* (25.80 ± 1.11). Бројот и понатаму расте кај *caries profunda* (41.70 ± 4.09) и кај *pulpitis* (69.82 ± 6.80).

Резултатите од испитувањето на дистрибуцијата на макрофагите покажаа висока статистичка сигнификантност од ($p < 0.01$) помеѓу сите испитувани групи (табела бр.18 и графикон бр.11)

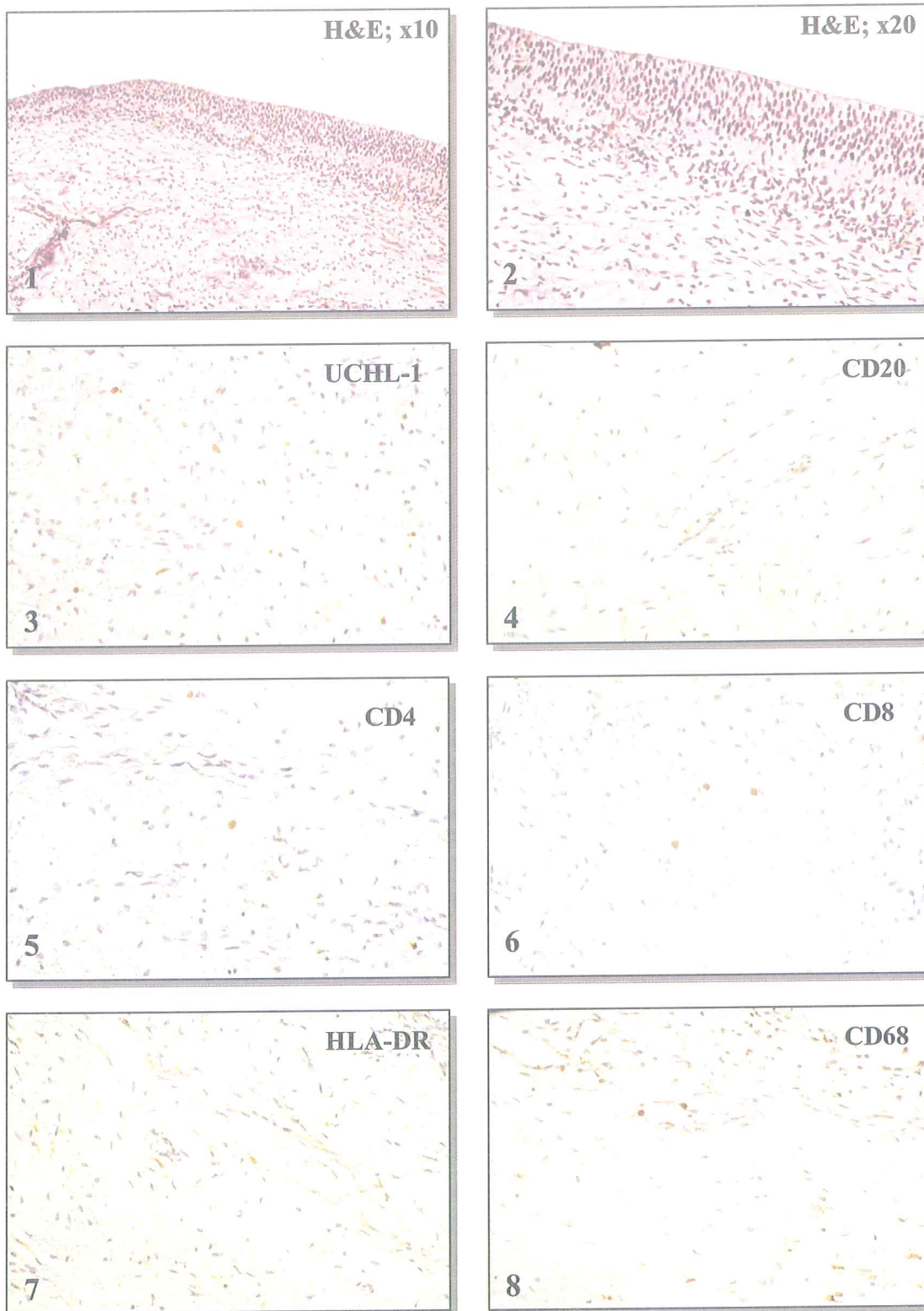
Табела бр. 18 Број на макрофаги (CD68) во хумана денитална пулпа од здрави заби и заби со различен степен на кариес

Клиничка дијагноза	Средна вредност	Стандард. девијација	Стандард. грешка	Мин.	Макс.	Медиана	Варијанса	Вкупен број
здрави заби	2.43	1.01	0.18	0.40	4.50	2.50	1.04	30
<i>caries superficialis</i>	6.85	1.67	0.12	5.30	7.43	6.80	0.45	30
<i>caries media</i>	25.80	1.11	0.20	20.06	28.40	26.20	1.24	30
<i>caries profunda</i>	41.70	4.09	0.74	35.70	48.32	42.01	16.75	30
<i>pulpitis</i>	69.82	6.80	1.24	56.20	79.60	70.25	46.35	30
Вкупно	29.32	26.28	2.14	0.40	79.60	4.45	691.050	150



Графикон бр. 11 Среден број на макрофаги (CD68) во хумана денитална пулпа од здрави заби и заби со различен степен на кариес

**7. ПРИКАЗ НА ПОЕДИНЕЧНИ СЛУЧАИ ОД АНАЛИЗИРАНИОТ
МАТЕРИЈАЛ**



Приказ на случај: пулпа од здрав заб

Слика бр. 1 и 2: хистолошки препарат од здрава пулпа. *Слика бр. 3:* ретки UCHL-1-позитивни Т лимфоцити во коронарниот дел од пулпата. *Слика бр. 4:* здрава пулпано ткиво во кое не се идентифицирани CD20 позитивни Б лимфоцити. *Слика бр. 5:* ретки CD4 позитивни Т лимфоцити *Слика бр. 6:* неколку CD8 позитивни Т лимфоцити. *Слика бр. 7:* ретки HLA-DR позитивни дендритични клетки во околина на крвен сад. *Слика бр. 8:* ретки CD68 позитивни макрофаги во близина на крвен сад.

8. ДИСКУСИЈА

Денталната пулпа е уникатен орган лоциран во специфична средина. Одредени анатомски и физиолошки фактори се одлучувачки за капацитетот на овој орган при спротивставувањето со бактериите и другите штетни агенси. Факт е дека цврстите минерализирани ткива што ја опкружуваат пулпата ја штитат од надворешни влијанија, патогени агенси и јатрогени повреди. Меѓутоа, таа заштита не е апсолутна, имајќи ја во предвид комуникацијата која се реализира преку дентинските каналчиња.

Кога ригидната физичка бариера од емајл и дентин ќе биде разрушена, штетните агенси преку дентинските тубули без пречка продираат во пулпиното ткиво. Токму во тоа се состои специфичноста и лимитираноста од навлегувањето на антигените во пулпата во однос на другите периферни ткива.

Со приближување на кариозниот процес (демнерализација на дентинот) на растојание од 0.5 до 1 мм од пулпата, во субодонтобласниот регион се забележува воспалителна клеточна реакција. Она што треба да се потенцира е фактот, дека оваа воспалителна клеточна реакција е резултат на *бактерискиите производи*, а не на бактериското присуство (инфекција) во пулпата.¹⁵³

Навлегувањето на патогените агенси во пулпиното ткиво предизвикува широк спектар на биолошки одговори на истото. Одговорите што се насочени кон бактериите имаат најголемо значење. Бактериските елементи дејствуваат како антигени и претставуваат потенцијални активатори на различните форми на имунолошки реакции. Оттука, може да се претпостави дека манифестацијата на овие одговори е под контрола на локалниот имунолошки систем кој е специфично адаптиран на анатомските облици на денталната пулпа.

Физиолошките карактеристики на дентинот, неговата пермеабилност и движењето на дентинскиот флуид се одлучувачки фактори што ја одредуваат количината на антигените кои ќе дојдат во контакт со пулпата. Овие карактеристики се поврзани со патофизиолошката состојба на пулпата (*Bergenholtz, 1990, Matthews и Vongsavan, 1994 и Pashley, 1994*). Потврдено е присуство на имуноглобулини во дентинските тубули кај здрави и кај кариозно променети заби (*Okamura и сор. 1980,1985, Ackermans и сор. 1981, Pekovic и сор. 1988*). Депонирањето на имуноглобулините во сидовите на дентинските тубули ја намалува нивната пермеабилност *Hahn (1997)*. На тој начин се овозможува заштита на пулпата од бактериски антигени и токсични продукти кои потекнуваат од кариозната лезија.

Проценка за проширеноста на воспалителните промени во пулпата под кариозната лезија може тешко да се направи. Одговорот на пулпата варира во зависност од брзината на напредувањето на кариозниот процес. Треба да се има во предвид фактот, дека кариесот претставува еден интермитентен процес со периоди на брзо ширење и периоди на мирување кои секако се одразуваат на пулпината реакција.

8.1. Хистопатолошки промени во пулпата регистрирани под светлосен микроскоп

Клиничката дијагноза за дадена патолошка промена на забите се базира на искуството на лекарот, симптомите и резултатите од разни тестови, и многу ретко кореспондира со патохистолошката дијагноза. За поставување на егзактна дијагноза (*точна проценка за состојбата на пулпата*) неопходно е да се направи испитување на хистолошки пресеци од пулпиното ткиво.¹³⁸ Мора да се нагласи дека поставувањето точна, патохистолошка дијагноза има практично и академско значење кога е во прашање кариес на забите. Третманот на кариесот има цел да го зачува виталитетот на пулпата и да овозможи излечивост на изменетата пулпа. Познавањето на состојбата на пулпата при кариес на забните супстанции е многу значајна за изборот на конзервативните терапевтски методи. Тоа во случај на воспаленија на пулпата (*pulpiti*) има само научно значење, а кога се во прашање *pulpitite* единствен терапевтски избор е ендодонтскиот третман на забот со отстранување на пулпата.⁸³ Познавањето на реакцијата на пулпата на патолошките иритации е од особено значење во детската стоматологија. Реакцијата на пулпата е слична со реакциите во другите мезенхимални ткива. Исти иритации под исти услови, во принцип, секогаш предизвикуваат идентични реакции кај индивидуите од иста возраст, значи реакцијата на пулпата е генетски условена во склоп на одбранбениот механизам на организмот во целина. Меѓутоа, ретко се случува сите услови кај различни индивидуи да бидат исти, што до извесен степен допринесува за индивидуалноста на одбранбениот одговор кај младата пулпа.¹⁴⁴

Генерално, ткивата во организмот реагираат на кој било вид иритација со воспалителна реакција која се манифестира преку комплекс на неуроваскуларни, лимфатични и други локални реакции. Меѓутоа, воспалителната реакција не смее да се изедначува со инфекција, што за жал, често се случува во клиничката пракса, бидејќи воспалението предизвикуваат и неинфективни агенси.

Оштетувањето на пулпиното ткиво од кој било вид иритација резултира со изумирање на клетки, а тоа предизвикува воспалителни реактивни промени во пулпата. Со воспалителни промени, пулпата реагира и при сосема мали дразби како што се оние од почетните

кариозни лезии, а кај длабоките кариозни лезии пулпата реагира со поинтезивни инфламаторни промени. На тоа упатуваат и резултатите од ова истражување. Степенот на воспалителните промени е пропорционален на интензитетот и тежината на оштетувањето на ткивото, предизвикано од навлегувањето на солубилните иритатори и инфламаторните стимуланси: бактериски токсини, бактериски ензими, антигени, хемотаксини, органски киселини и производи од клеточната деструкција. Во кариозниот дентин утврдено е присуство на плазма протеини, имуноглобулини и протеини на комплементот. Се претпоставува дека некои од овие фактори се способни да ја инхибираат активноста на бактериите во лезијата.

Бидејќи интензитетот на промените во пулпата е пропорционален на интензитетот од иритациите, логично е, да се очекува и различен степен на реактивни промени во пулпата при различни етапи од напредувањето на една кариозна лезија.

Првобитните сфаќања за случувањата во пулпата при кариес на емајлот (*caries superficialis*), се дека таа не покажува никакви знаци на реакција во овој стадиум од развојот на кариозната лезија (Massler 1967). Наспроти овие сфаќања, денес општо прифатен став е дека одредени промени во пулпата се случуваат и пред кариозниот процес да се прошири во дентинот (Brannstrom и Lind, 1965). Испитувањата направени во рамките на оваа студија ги потврдуваат овие ставови. Промените во пулпата кај почетниот кариес се забележуваат во одонтобласниот слој, во смисла намалување на бројот и големината на одонтобласните. Капиларните крвни садови во пределот на пулпата кои се наоѓаат под кариозната лезија покажуваат лесна дилатација. Лесно е зголемен и бројот на инфламаторните клетки, како резултат од навлегување на бактериски продукти. Почетниот инфламаторен клеточен инфилтрат се состои претежно од лимфоцити и ретки макрофаги. Регистрираните промени во пулпата го претставуваат одговорот на ткивото од дифузијата на солубилните иритатори и инфламаторни стимуланси (бактериски токсини, бактериски ензими, антигени, хемотаксини, органски киселини и производи од клеточната деструкција).

Проширувањето на кариозниот процес во дентинот предизвикува понагласени реакции во пулпата. Тие се во директна зависност од длабочината на кариозната лезија. Така, кај забите каде што *кариесот* *зафаќа* *една* *прешина* *од* *дебелина* *на* *примарниот* *дентин* (*caries media*), во пределот каде што завршуваат зафатените дентински тубули во пулпата се забележува почетна акумулација на лимфоцити и макрофаги. Бројот на овие воспалителни клетки не е доволен за да се окарактеризира како инфламаторен ексудат, па затоа промените може да се опишат како пулпи во “преоден стадиум” на воспаление. Како резултат на дејството од бактериските продукти кои навлегувале во

пулпата, фибробластите претрпеле почетни дегенеративни промени во вид на почетна фиброза, кои ги регистриравме под микроскоп. Овие промени се придружени и со стеснување на "Weill-та зона". Неспецифичните медијатори на инфламацијата ослободени од оштетените клетки во пулпата (хистамин, брадикинин, метаболити на арахидонската киселина), еластазата, катепсин G и лактоферинот (продукти од лизозомите на полиморфонуклеарните леукоцити), протеазните инхибитори (антитрипсинот), неуропептидите (calcitonin gene-related peptide, substance P) предизвикуваат промени во крвните садови на пулпата во проекција под кариозната лезија во вид на лесна дилатација. Крвните садови се исполнети со еритроцити. Промените присутни во пулпите при *caries media* се од таков степен што се уште имаат реверзибилен карактер. Ова има големо значење од клинички аспект при планирањето на третманот на овие лезии.

Веќе напоменавме дека степенот на воспалителните промени во пулпното ткиво е директно пропорционален на длабочината на кариозната лезија. Оттаму, логично е, кај заби со *caries profunda*, во целина да се очекуваат поистакнати промени во пулпното ткиво, во споредба со оние кај *caries media*, а тоа го потврдија и испитувањата. Во пулпата, кај заби со *длабока кариозна лезија* (со тенок слој на здрав дентин над пулпата), знаците на инфламаторната реакција се поизразени, претставени преку акумулација на голем број лимфоцити и макрофаги, помал број плазма клетки, како и неутрофилни леукоцити (гранулоцити). Во исто време, во околината на акумулацијата на инфламаторните клетки во пулпата постои и почетна пролиферација на мали крвни садови и фибробласти како и депонирање на колагени влакна. Ваквиот инфламаторен одговор се толкува како *инфламаторно-репаративен процес*. Нашите наоди се во согласност со оние на *Reeves and Stanley, (1968)* кои утврдиле дека инфламаторниот одговор е незначителен кога оддалеченоста помеѓу бактериите и пулпата, вклучувајќи ја и дебелината на репаративниот дентин што е околу 1.1мм или повеќе, а кога лезиите се до 0.5мм од пулпата степенот на инфламацијата во пулпата е сигнификантно зголемен, но сепак, истата не била навистина инфламирана се додека бактериите не се навлезени и во репаративниот дентин.

Промени во пулпата како резултат на кариес се забележани и во однос на нејзината метаболна и пролиферативна активност (*Kobayashi and sor, 1996*). *Метаболната активност* на денталната пулпа, со исклучок на одонтбластите е зголемена во раните фази на денталниот кариес, а се интензивира со степенот на прогресијата на кариозната лезија, додека *пролиферативната активност* на пулпните клетки се зголемува само во доцните фази од кариозното заболување.

Секоја инфламаторна реакција (воспалителна промена) на пулпата кај длабоките кариозни лезии не резултира со трајно оштетување на ткивото. Ако кариозната лезија во овој стадиум се санира, може да настане репарација на сврзното ткиво во пулпата преку формирање на колагено (лузничаво) ткиво на местото од оштетувањето. Во текот на репарацијата на пулпата кај *caries profunda* се јавува фиброза која комплетно го заменува оштетеното ткиво на пулпата поради што не може да настане нејзина целосна излечивост ("*restitutio ad integrum*"). Поради тоа, се наметнува потребата денталниот кариес да биде третиран пред да прогресира во длабочина.

Денталниот кариес е долготраен процес и лезијата прогресира во период од неколку месеци до неколку години. Просечното време кое е потребно да се развие кариесот од почетниот стадиум па до клинички видлива кариозна лезија кај деца е 18 ± 6 месеци.⁹⁹ Поради тоа, не треба да не изненадува фактот, што инфламацијата во пулпата предизвикана од кариозната лезија започнува почесто како слаб хроничен инфламаторен одговор отколку како акутна реакција. Промените кои настануваат во пулпата се слични со старосните промени како што се фиброзирањето на пулпата, создавањето на калцификати (дентикли) и други.⁷² Продукцијата на колагенот се интензивира, а со тоа се менува соодносот помеѓу клетките и влакната во пулпата. Младата пулпа подлежи на прерано стареење како резултат на "*фиброзаџија*", која всушност треба да го прекине и неутрализира дејството на иритаторот. Од друга страна, поголемата количина на колагенот во однос на основната супстанција ја прави пулпата поотпорна кон протеолитичните ензими.

Степенот на проширеност од инфламација во пулпата под кариозната лезија зависи од длабочината на бактериската инвазија, како и од степенот до кој е намалена пропустливоста на дентинот од склерозата на дентинот и формирањето на репараторниот дентин. Пермеабилноста на дентинот се смета за клучен фактор во детерминирање одговор на пулпата, односно токму поради тоа пулпиното ткиво реагира на кариозната лезија многу порано уште пред да настане бактериска пенетрација во пулпата (*Trowbridge, 1981* и *Bergenholtz, 1990*). Една од одбранбените реакции на пулпата, тубуларната склероза на дентинот, депонирање на минерали во тубулите (*Trowbridge, 1981, Thylstrup* и *Fejerskov, 1994*) е позитивен момент кој доведува до намалена пермеабилност на дентинот. Овој одбранбен механизам исчезнува со прогресирањето на кариозната лезија, пермеабилноста повторно се зголемува што резултира со значително зголемување на сите видови на имунокомпетентни клетки во пулпата.

Целокупните промени кои ги регистриравме кај *caries profunda*, говорат дека овој стадиум од развојот на кариозната лезија се

квалификува како критична фаза која води кон настанување на иреверзибилни промени во пулпата.

Пред да биде експонирана, пулпата покажува голем одбранбен капацитет против кариесот. Со деминерализацијата на преостанатиот здрав дентин кон пулпата овозможено е слободно навлегување на бактериите и нивните метаболни продукти во пулпата поради што инфламаторниот одговор во пулпиното ткиво станува многу силен. Пулпиниот одговор ги покажува сите знаци карактеристични за акутното воспаление што се манифестираат како васкуларен и клеточен одговор во форма на вазодилатација, зголемена васкуларна пермеабилност и акумулација на леукоцити. Неутрофилните леукоцити (гранулоцити) мигрираат од крвните садови на местото од повредата, привлечени од одредени распадливи продукти на комплементот кои се силно хемотактични. Овие продукти се создаваат кога комплементот е активиран во присуство на комплекси од антиген-антитело.⁵⁸

Проследувањето на забите со експонирана пулпа (*pulpitis*) укажува на уште поголеми промени во пулпиното ткиво, во споредба со оние што се среќаваат во пулпата на забите, каде таа се уште не е експонирана. Всушност, воспалителните промени во пулпата кои се резултат од дејствувањето како на иритаторите, така и на бактериите кои навлегле од карнозната лезија, веќе се манифестираат со иреверзибилно оштетување на пулпиното ткиво и негова замена со гранулационо ткиво. Пролиферираното младо гранулационо ткиво е составено од голем број на млади крвни садови. Како резултат од присуството на микроорганизмите и нивните нус-продукти во пулпата се формира воспалителен ексудат кој содржи голем број воспалителни клетки, дифузно распоредени. Овој инфилтрат е составен од голем број на лимфоцити, гранулоцити (неутрофилни леукоцити) како и макрофаги кои се одговорни за ресорпцијата на распадливи продукти од воспалението. Со напредувањето на инфламаторниот процес, локално, на местото од воспалението, во пулпиното ткиво како резултат на пореметено крвоснабдување, присуството на лизозомалните ензими од дезинтегрираните леукоцити, во некои случаи се забележува формирање на мали апсцеси и некротични фокуси. Кога преку карнозната лезија постои можност за дренажа, акумулацијата на неутрофилите доведува до површинска деструкција (улкус) во пулпата. Улкусот е составен од некротичен дебрис и акумулација на неутрофилни леукоцити, а во подлабоките слоеви на пулпата се забележува гранулационо ткиво инфилтрирано со хронични инфламаторни клетки. Во одредени случаи кај млади трајни заби, воспалението на пулпата резултира со формирање на пулпин полип, составен од пролиферирано младо гранулационо ткиво богато со крвни капилари и нервни завршоци.

Овој наод е карактеристичен за пулпите кои имаат голема одбранбена и репараторска моќ.

По појавата на *акутно воспаление на пулпата* се изразени клинички симптоми, нејзината реакција може да оди во повеќе правци. Кога иритирачкиот фактор е отстранет (во случај на примена на адекватна терапија) во пулпиното ткиво се формира белег, лузна. Ова се случува кај младите трајни заби. Кај млечните заби воспалителниот процес ретко се завршува со репарација на пулпата, и тоа се објаснува со "*сипароси на млечните заби*". Многу почесто доаѓа до воспоставување на рамнотежа меѓу одбранбениот механизам на пулпата и иритирачките фактори при што оваа рамнотежа клинички се манифестира во облик на *хронично воспаление на пулпата*. Овој процес може со години да егзистира и да не предизвика евидентни клинички симптоми. Дури кога ќе се надоврзе нова иритација како што е препарација на кавитетот, хемиска иритација или друго, рамнотежата меѓу одбранбениот механизам на пулпата и иритацијата се пореметува и повторно настанува акутно воспаление. Тогаш може да се говори за егзацербација на хроничен *pulpitis*. Кај деца оваа егзацербација е многу почеста поради поистакнатите реакции во се уште неформираниот ендодонциум.

Воспалителниот процес не мора секојпат да минува низ акутен стадиум за да продолжи во еден хроничен тек. Во случај кога иритациите се слаби, но константни како што се хроничен кариес, благи механички иритации, благи хемиски иритации и друго, воспалителниот процес уште во почетокот може да заземе хроничен тек.

Во инфламирања и некротична пулпа понекогаш може да се забележи присуство на нормални структурни нервни елементи, што при ендодонтски третман даваат резидуална сензитивност. Оваа специфична карактеристика на нервите, функционално да преживеат во области на оштетување, па дури и некроза на пулпата, е забележана од повеќе автори (*Torneck* и сор. 1977,1981 и *Piskin* и сор. 1993). Како можно објаснување за функционалното преживување на нервните влакна се наведува присуството на колагени влакна околу аксоните на периферните нерви и централните нервни сплетови. Иако постои разградување на перинеуралниот и пулпиниот колаген во текот на инфламаторниот процес, возможно е *количината или квалитетот на колагенот* што се наоѓа околу нервите да обезбедува нивна поголема заштита.

Хроничното воспаление на пулпата често вклучува ваков тип на реакции каде *деструкцијата* на ткивото и *репарацијата* скоро подеднакво се одвиваат; т.е. периодите на деструкција се заменуваат со периоди на репарација. Во хронично инфламирања пулпа се забележуваат фибробласти и колагени влакна кои се испреpletуваат со

хронични инфламаторни клетки. Сите елементи за репарација на оштетеното ткиво се присутни, но заздравување не настанува се додека комплетно не се елиминира причинителот. Затоа ваквата репарација *Trowbridge, (1990)* ја нарекува “фрустрирана репарација”.

Како одговор на инфекција, во пулпата се јавува и *антиген-специфичниот и неспецифичниот имунолошки одговор*. Во здрава пулпа нормално се присутни само ретки Т клетки, макрофаги и дендритични клетки. Во пулпата како одговор на бактериската инвазија и/или дифузија на бактериските продукти од кариозната лезија преку дентинските тубули, навлегуваат и полиморфонуклеарни леукоцити (гранулоцити) и моноцити. Како што инфекцијата напредува во длабочина заземајќи хроничен тек, пулпиниот имунолошки одговор зазема “мешан” карактер и се состои од Т клетки, Б клетки и плазма клетки како специфични компоненти, а гранулоцитите и моноцитите, како неспецифични компоненти.

Полиморфонуклеарните леукоцити се клетки што ја претставуваат првата одбранбена линија против инфективните агенси и се еден од главните извори на протеолитични ензими кои се одговорни за оштетувањето на ткивото во текот на инфламаторниот процес. Бројот на неутрофилните гранулоцити во пулпата кај заби со кариес одговара на степенот на нејзината инфламација која е резултат од прогресијата на кариозната лезија. Тие не ја инфилтрираат пулпата во доволно голем број за да предизвикаат нејзино оштетување, се додека бактериите или инфламаторните продукти не навлезат во неа како резултат на траума, кариес или реставративни процедури. Неутрофилните леукоцити се клетки кои се карактеристични за акутното воспаление, а имајќи го во предвид хроничниот тек на кариозниот процес од резултатите добиени во оваа теза се гледа дека гранулоцитите се отсутни кај *здравиите* и забите со *caries superficialis*. Нивниот број е незначително зголемен кај *caries media*. Со приближувањето на кариозниот процес кон пулпата, инфламаторниот одговор на пулпното ткиво станува се повеќе акутен што се гледа од значителното зголемување бројот на гранулоцитите кај *caries profunda*. Најголем број на гранулоцити е забележан кај *pulpitite* особено кај оние со формирана апсцесна шуплина. Како резултат на овие случувања најчесто следува *иреверзибилно оштетување на пулпата*. Нашите резултати се во целосна согласност со резултатите на *Izumi* и *сop. (1995)*. Тие, исто така регистрирале значително зголемување на бројот на гранулоцитите кај забите со *caries profunda* и *pulpitite* што претставува важен податок за проценка на состојбата на пулпата под кариозната лезија.

Кај *pulpitite* со зголемување на бактериските распадливи продукти и активацијата на комплементот, а поради развојот на локалната имунолошка реакција и акумулирањето на метаболитите од разградбата

на арахидонската киселина, се случува деструкција на клеточните елементи. Како резултат на овие збиднувања на местото од повредата на ткивото се привлечени неутрофилните леукоцити. Во напреднатиот стадиум од имунолошката реакција на денталната пулпа зголемен е бројот на макрофагите и неутрофилите. Од нив се ослободуваат лизозомални ензими што предизвикуваат деструкција на ткивото и доведуваат до негово уништување, некроза (Kumar и сор. 1992).

Кариозното експонирање на пулпата резултира со прогресивна мобилизација на неутрофилите и води до супурација која може да биде дифузна или локализирана во форма на *ајсцес*. Гнојниот секрет се формира кога неутрофилните леукоцити ќе ги ослободат нивните лизозомални ензими и околното ткиво е лизирано, процес познат како *ликвифакциона некроза*. Ова распаднато ткиво има поголем осмотски притисок кој е една од причините што апсцесот предизвикува болка, што се губи со воспоставување на дренажа.

Гранулоцитите се еден од главните извори на протеолитични ензими кои се одговорни за оштетување на пулпиното ткиво за време на инфламаторниот процес. Нивниот број најмногу се зголемува при бактериска инвазија на пулпата со што компонентите од лизозомалните гранули може многу лесно да се ослободат во околното ткиво. Покрај улогата на гранулоцитите во регулација на инфламаторниот процес, како и за елиминација на бактериите и некротичниот материјал од пулпиното ткиво, тие во исто време можат да доведат и до оштетување на здравото ткиво, допринесувајќи на тој начин во патогенезата на пулпиното заболување. Ослободувањето на содржината од нивните лизозомални гранули (еластаза и лактоферин) е претходник на *иреверзибилното оштетување на пулпата*. Детектирањето на значајни количини од овие два лизозомални ензими кај средно и јако инфламирана хумана дентална пулпа е во прилог на заклучокот дека постои корелација помеѓу количината на овие две компоненти и иреверзибилното оштетување на пулпиното ткиво (Rauschenberger CR и сор. 1997).

Еластазата како неутрална серумска протеаза и компонента на лизозомалните гранули на полиморфонуклеарните леукоцити доведува до елиминација на бактериите. Но во текот на овој процес се јавува и симултана деградација на протеогликаните и колагенот тип III кои што се главни компоненти на екстрацелуларниот матрикс во денталната пулпа. Овој процес допринесува за деструкција на пулпиното ткиво (Nakanishi и сор. 1995).

Во инфламираната дентална пулпа присутни се различни фактори од хуморалниот имунитет претставени преку различни количини на имуноглобулини и плазма клетки, во зависност од длабочината на кариозната лезија. (Speer и сор. 1977, Pulver и сор. 1977)

Во нашите испитувања плазма клетки не беа детектирани во здрави заби и заби со *caries superficialis*. Овој наод има поткрепа од фактот дека во здравата пулпа и онаа кај *caries superficialis* се уште нема навлегување на бактериски антигени кои ќе предизвикаат појава на плазма клетки. Нивното присуство во многу мал број се забележува кај *caries media* како резултат од навлегувањето на бактериските продукти преку дентинските тубули. Прогресијата на кариозната лезија резултира со се поголемо присуство на бактериски антигени на што пулпата реагира со зголемување на бројот од плазма клетките. Токму кај *caries profunda*, тоа се случува, а со експонирањето на пулпата бројот на плазма клетките уште повеќе се зголемува. Нашите наоди се во согласност со наодите на Izumi и сор. (1995) кои забележале значително зголемување на бројот од плазма клетките кај *caries profunda*. Кај *pulpitite* нивниот број, како и во нашите резултати бил еноормно зголемен.

Од испитувањата на Torneck 1974, 1977, Lin и Langeland 1981, Langeland 1987 произлегува дека антителата се вклучени во патолошките состојби на пулпата. Тие утврдиле поголем број на плазма клетки кај хронично инфламира на пулпа од кариозно променети хумани заби. Плазма клетките претежно продуцираат IgG (Pulver и сор. 1977, Pekovic и Fillery 1984), а концентрацијата на имуноглобулините во инфламира на хумана дентална пулпа е поголема отколку во неинфламираните пулпи (Speer и сор. 1977).

Резултатите добиени во оваа студија, анализирани заедно со резултатите добиени од другите автори, укажуваат на отсуство на плазма клетки во раните фази од развојот на кариесот. Според тоа можеме да кажеме дека имуноглобулините кои во различни студии се детектирани во дентинот и во одонобластниот слој не потекнуваат од плазма клетките во пулпата, туку тие дифундираат од крвниот серум. За ваков наод говорат и Okamura и сор. (1985).

Во понапреднатите стадиуми од развојот на кариозната лезија, особено кај *caries profunda* и *pulpitite*, бројот на плазма клетките значително се зголемува со што се создаваат можности за локална продукција на имуноглобулини во пулпиното ткиво. Овој наод може да го потврдиме со наодите на Falkler и сор. (1987).

Инфламираните пулпини ткива содржат различни типови на плазма клетки кои се способни да создаваат имуноглобулини. Притоа, преобладаваат плазма клетките кои создаваат IgG, повеќе од 60%. Значителен број на плазма клетки продуцираат IgA и IgE, а само некои плазма клетки продуцираат IgM. Присуството на плазма клетки кај инфламираните пулпи е во прилог на фактот дека пулпата е опремена со голем имунолошки потенцијал кога таа треба да се справи со причинителите за нејзиното заболување.

8.2. Имунохистохемиска анализа

Долго време не беше сосема јасно како е организиран имунолошкиот систем на пулпата. Истражувањата спроведени во последниве години доведоа до откривање на многу нови сознанија за тоа како функционира имунолошкиот систем. Како резултат на тоа добиени се и многу нови сознанија за имунолошките механизми во денталната пулпа.⁵³

Неодамнешните имунохистохемиски и други морфолошки студии покажаа дека во денталната пулпа има множество на имунокомпетентни клетки кои се постојано присутни во неа и такви клетки кои повремено рециркулираат во неа. Овие клетки формираат мрежа која ја надгледува инвазијата од штетните стимуланти и при повреда го воспоставува редоследот на реакции што ја карактеризираат специфичноста на пулпиното заболување.

Фактот дека хуманата дентална пулпа содржи лимфен систем, јасно укажува на слободниот пат што го имаат лимфоцитите со можност да навлезат во пулпиното ткиво. Б и Т лимфоцитите се примарни ефекторни клетки на хуморалните и клеточно посредуваните имунолошки реакции. Овие имунокомпетентни клетки може или да ја заштитат пулпата од мала и незначителна инвазија на бактерии или да предизвикаат инфламаторна реакција која ќе заврши со пулпина некроза, ако е бактериската инвазија масивна.

Голем број од студиите се изработени со примена на светлосен и електронски микроскоп и укажуваат на тоа дека во кариозно променета хумана дентална пулпа се среќава хроничен инфламаторен инфилтрат, составен од макрофаги, лимфоцити и плазма клетки. (*Massler, 1967, Torneck 1974, 1977, Lin и Langeland 1981, Langeland 1987*). Во последната декада точниот состав на воспалителниот инфилтрат е уште попрецизно утврден со помош на имунохистохемиските испитувања и употребата на моноклоналните антители.^{35,36,149}

Идентифициран е и одреден бројот на Б и Т лимфоцитите во пулпиното ткиво од кариозни заби кои клинички се дијагностицирани како реверзибилни или иреверзибилни воспаленија на пулпата. Бројот на овие клетки се зголемува во корелација со јачината на клиничките симптоми. Односот на Б клетките со пан Т клетките и оној на хелперните со супресорните Т лимфоцити е повисок кај иреверзибилната група, споредено со реверзибилната група што укажува на преминација на Б лимфоцитите и хелперните Т лимфоцити кај иреверзибилно оштетени пулпи (*Hahn и сор. 1989*).

Проучувањата од корелацијата на воспалителниот инфилтрат и длабочината на кариозната лезија укажуваат на асоцијација на длабочината на кариесот со зголемувањето како на Т лимфоцитите така

и на Б лимфоцитите (*Sakamoto и Sanyo, 1992; Izumi и сор, 1995, Sotirovska-Ivkovska и сор. 1999, 2000*). Т лимфоцитите покажуваат зголемување дури и кај забите со површен кариес, додека бројот на Б лимфоцитите и плазма клетките е зголемен само кај забите со длабок кариес. Од ова произлегува дека во текот на кариозниот процес, Б лимфоцитите и плазма клетките се појавуваат подоцна од Т лимфоцитите во пулпното ткиво, што ја потврдува претпоставката за централната улога на Т лимфоцитно посредуваниот имунолошки одговор во иницијација на пулпниот специфичен имунитет, по експозиција на протеински антигени. Најверојатно, сигналите од страна на Т лимфоцитите се предуслов за активација на други антиген специфични ефекторни клетки како што се Б лимфоцитите.

8.2.1. Т лимфоцити

Порано се сметало дека здравата неинфламирана дентална пулпа не содржи лимфоцити (*Seltzer и Bender, 1984*). Меѓутоа, од неодамна ова тврдење е отфрлено. Испитувањата на *Jontell и сор. (1987)* со помош на имунохистохемиската техника и употребата на моноклонални антители покажаа дека во здрава хумана дентална пулпа се наоѓаат Т лимфоцити кои се сметаат како нејзин нормален есенцијален дел. Т лимфоцитите се претставени со нивните субпопулации: хелперни (*CD4*) и супресорни (*CD8*) лимфоцити, при што *CD8* клетките се побројни од *CD4*, а нивниот однос изнесува 0.26. Добро е познато дека *CD8* супресорните клетки ги инхибираат Б клетките и одредени Т клеточни субпопулации така што ја избегнуваат можноста од појава на ексцесивни имунолошки одговори.

Во оваа студија, кај пулпите од *здрави заби* забележани се ретки Т лимфоцити (4.64 ± 1.59) локализирани претежно периферно, и тоа главно во коронарниот дел на пулпата. Овие резултати, се во согласност со наодите на *Jontell и сор. (1987)*. Слични резултати на здрави хумани заби добиле и *Hahn и сор. (1989)* и *Gregoire G и сор. (1990)*. Со имунохистохемиско испитување на здрава пулпа од стаорец пронајдени се *CD4* и *CD8* Т лимфоцити (*Okiji и сор. 1992*). *CD8* клетките се побројни во однос на *CD4* клетките. Овие Т лимфоцити најчесто се разместени по должината на крвните садови во внатрешните делови на пулпата. Нашите резултати наоѓаат потврда и во наодите на *Gregoire G и сор. (1990)*, и тоа дека кај пулпите од здрави заби присутни се ретки супресорни Т лимфоцити (*CD8*) кои преобладаваат над многу малиот број на хелперни лимфоцити (*CD4*). Притоа кај пулпите од здрави заби тие се локализирани на периферијата на пулпното ткиво, односно на местата каде постои можност за потенцијален влез на антигени, а кај инфламмираните пулпи тие се забележани и во нивните централни

делови. Спротивно од нашите наоди, анализите направени со помош на проточна цитометрија покажале присуство на *CD4* и *CD8* позитивни клетки при што се пронајдени повеќе *CD4* отколку *CD8* клетки (Mangkornkarn и сор. 1991).

Од резултатите во оваа студија може да се каже дека со прогресијата на кариесот расте и бројот на Т лимфоцитите, кој е мал кај *caries superficialis* и *caries media* (7.09 ± 2.34 , односно 19.58 ± 11.14). Нивниот број нагло се зголемува кај *caries profunda* (89.69 ± 12.68), а уште повеќе кај *pulpitite* (132.99 ± 8.58). Кај кариозни заби, Hahn и сор. (1989), Sakamoto и Sanjo (1992), Izumi и сор. (1995) исто така утврдиле евидентно зголемувањето на бројот на Т лимфоцитите во сите испитувани примероци. Според овие автори најголемиот дел од Т лимфоцитите, изгледа, е составен од клетки кои “паметат” поради нивната честа имунореактивност со *CD45RO* антителото. Нашите наоди и наодите од литературата го подржуваат поставениот концепт дека Т лимфоцитно посредуваниот имунитет има примарна улога во раниите фази на пулпините имунолошки одбранбени реакции против кариесот, преку локалната антигена презентација со помош на пулпините дендритични клетки и Т лимфоцитите.

Најновите истражувања во сферата на имунологијата укажуваат дека неуропептидите имаат некој вид на модулаторна улога (стимулаторна и/или инхибиторна) во интеракцијата на пулпините дендритични клетки со Т лимфоцитите (Okiji и сор. 1997b). Се смета дека оваа интеракција ја потпомага имуно-клеточната инфилтрација преку создавањето на цитокини кои можат да ја регулираат експресијата на адхезивните молекули на васкуларните ендотелни клетки (Jontell и сор. 1996). Ваквиот механизам, веројатно, има учество во почетните стадиуми на имунолошката одбрана на пулпата против кариесот.

За состојбата на пулпата во одредени стадиуми на кариес значење има и квантитативната застапеност на Т лимфоцитите, како и бројот и односот на субпопулациите на Т лимфоцитите (*CD4* и *CD8*). На оваа релација нашите истражувања покажуваат константен пораст на *CD4* лимфоцитите со прогресија на кариозната лезија, од минималното присуство кај здравите заби до значителното зголемување кај *caries profunda* и максималната нивна застапеност кај *pulpitite*.

Постојат битни разлики во присуството на *CD8* лимфоцитите во пулпата во различни етапи од прогресијата на кариозната лезија. Овие клетки се присутни во поголем број и кај здравите и кај забите со *caries superficialis* и *caries media* ($4,95 \pm 1.20$; $14,09 \pm 1.79$ и $45,07 \pm 4.34$) за разлика од *CD4* лимфоцитите ($1,12 \pm 0.82$; $3,22 \pm 1.09$ и $10,51 \pm 2.41$). Бројот на *CD8* лимфоцитите во пулпата нагло се зголемува кај заби со *caries profunda* ($82,30 \pm 6.16$), но нивниот број само незначително е зголемен кај *pulpitite*

(85,03±10.94) што не е случај и со *CD4* лимфоцитите чиј број расте кај *caries profunda* (69,82±6.80) и кај *pulpite* (104,27±6.42).

Што се однесува до односот на субпопулациите на Т лимфоцитите евидентна е преминацијата на супресорните Т лимфоцити (*CD8*) со хелперен, супресорен (*CD4/CD8*) однос кој е идентичен и кај пулпите од здрави заби и кај пулпите зафатени со *caries superficialis* (0,22). Сосема незначително, повисок е нивниот однос кај *caries media* (0,23).

Доминацијата на Т лимфоцитите од вкупниот број на лимфоцити, околу 60% и односот на субпопулациите *CD4/CD8* од 0,84 кај *caries profunda*, зборува за оштетување на пулпата кое се уште е *реверзибилно*. Како една од хипотезите за објаснување на реверзибилноста на пулпното оштетување при кариес се смета регулаторната функција на супресорните Т лимфоцити (*CD8*). Тие претставуваат клучен фактор за *реверзибилноста на пулпното оштетување* на тој начин што влијаат за намалување на инфламаторниот процес во пулпата.

Претходно презентирани наоди на Т лимфоцити и нивниот однос *CD4/CD8* кај пулпите од заби со кариес, битно се разликува од наодите кои ги добивме кај пулпите зафатени со *pulpitis*. Покрај бројната застапеност на хелперните (*CD4*) Т лимфоцити, и односот од 1.22 помеѓу хелперите и супресорите (*CD4/CD8*), присутни се и голем број на Б лимфоцити, плазма клетки, макрофаги и неутрофилни леукоцити. Целокупниот овој наод укажува на формирање на апсцесна формација во пулпата што е во прилог на *иреверзибилно оштетување на пулпното ткиво*, без можност за негово заздравување.

8.2.2. Б лимфоцити

Спротивно од Т лимфоцитите, Б лимфоцитите многу ретко се среќаваат во здрава дентална пулпа. Нашиот наод говори за отсуство на Б лимфоцити во здрава дентална пулпа. Некои истражувачи исто така не успеале да идентификуваат Б-лимфоцити во хумана дентална пулпа со употреба на имунохистохемија со антисеруми за имуноглобулини (*Pulver* и сор. 1977, *Pekovic* и *Fillery*, 1984) или со употреба на моноклонални антитела кои се специфични за Б лимфоцитите (*Mangkornkarn* и сор. 1991, *Sakamoto* и *Sanjo* 1992). Во согласност со овие наоди се и резултатите на *Jontell* и сор. (1987) кои испитувајќи го присуството и локализацијата на различни имунокомпетентни клетки кај ниедна од анализираните пулпи не идентификувале присуство на Б клетки. Тие образложуваат дека ваквиот наод не може да се припише на неадекватноста на методологијата бидејќи во текот на анализата тие употребувале позитивни контроли што биле изработени од лимфни јазли и од сврзно ткиво на воспалена гингива. Ваквите наоди ја наметнуваат

претпоставката дека Б лимфоциите, најверојатно, не имигрираат во иницијалната фаза на имунолошкиот одговор на пулпното ткиво.

За разлика од нив други истражувачи покажале присуство на Б лимфоцити во здрава хумана дентална пулпа (Hahn и сор. 1989, Izumi и сор. 1995). Во овие студии авторите кај здрави пулпи нашле ретки Б лимфоцити чиј број бил значително мал. Okiji и сор. (1996), експериментално кај здрава пулпа од стаорци констатираат зголемување на бројот на Б лимфоцитите со напредувањето на нивната возраст. Нивното присуство го објаснуваат како резултат на антигените стимуланти низ хронично експонираните дентински тубули. Тие заклучуваат дека од досегашните сознанија тешко може да се одреди колку е значајна улогата на Б лимфоцитите во здрава дентална пулпа.

Отсуството на Б лимфоцитите во поголем број на студии, сугерира дека тие не се присутни во сврзното ткиво на здрава пулпа. Меѓутоа, прашањето за присуството на Б лимфоцитите во здрава, неинфламирана пулпа се уште е контроверзно, бидејќи досега само два истражувачи демонстрирале присуство на Б лимфоцити, иако тој број е занемарливо мал.

Нашите испитувања кога се во прашање Б лимфоцитите укажуваат на нивна појава во првиот стадиум од развојот на кариозната лезија (*caries superficialis*), во незначителен број ($1,52 \pm 0.79$). Со напредување на кариозната лезија нивниот број се зголемува (*caries media* - $4,71 \pm 3.42$). Приближувањето на кариозната лезија кон пулпата нагло го зголемува бројот на Б клетките (*caries profunda*, $51,18 \pm 4.26$). Кај *pulpitis* бројот на клетките е нормно се зголемува достигнувајќи ги вредностите од $241,54 \pm 11.34$. Резултатите од квантитативната анализа покажуваат дека застапеноста на Б лимфоцитите во пулпата кореспондира со степенот на прогресија на кариозната лезија. Прогресивно зголемување на Б лимфоцитите со напредувањето на патолошкиот процес утврдиле и Hahn и сор. (1989) и Izumi и сор. (1995). Оваа констатација е заедничка за сите истражувања, вклучувајќи ја и нашата студија, а разлики се јавуваат само од аспект на квантитет.

Присуството на Б лимфоцити кај хронично воспалена пулпа од кариозни заби преку испитувањето на повеќе типови на имуноглобулини во инфламирана дентална пулпа констатирале повеќе автори (Massler 1967, Torneck 1974, 1977, Lin и Langeland 1987). Резултатите од нивните истражувања укажуваат на фактот дека инфламираната пулпа содржи значителен број на плазма клетки кои продуцираат имуноглобулини. Овие наоди се во согласност и со наодите на Speer и сор. (1977), кои известуваат дека концентрацијата на имуноглобулините во инфламираната хумана дентална пулпа е многу поголема отколку кај неинфламираната пулпа.

Нашите наоди и наодите на другите истражувачи што укажуваат на отсуство на Б клетки кај здрави пулпини ткива се во прилог на фактот дека продукцијата на антителата кај *caries superficialis* и *caries media* се случува во локалните лимфни јазли. Од друга страна *хуморалниот имунолошки одговор од страна на Б клетките*, вклучувајќи ја и продукцијата на антитела, почнува да се јавува кај *caries profunda* при што најголема експресија има кај *експонираната пулпа (pulpitis)*.

Во оваа теза е направен обид преку одредување на односот меѓу Б и Т лимфоцитите да се сугерира можноста за *имунохистолошка дијагноза кај васкуларните заболувања на пулпата*. Од анализираните резултати можеме да видиме дека односот на Б и Т лимфоцитите кај здрави заби е 0 (бидејќи ние кај нив не идентифициравме присуство на Б клетки), кај *caries superficialis* и кај *caries media* тој има мала вредност поради доминацијата на Т лимфоцитите над малиот број Б лимфоцити (0.21 односно 0.24). Кај *caries profunda* односот се зголемува со покачување на бројот на Б клетките, и изнесува 0.57, додека кај *pulpitis* тој е екстремно висок поради драстичното зголемување на Б лимфоцитите во однос на Т лимфоцитите, и изнесува 1.81.

Корелацијата помеѓу бројот на Б и Т лимфоцитите (Б и Т) од 1.81 сугерира дека овој однос може да се употреби како индекс во имунохистолошката дијагноза *кај иреверзибилно оштетената пулпа*. Сепак, потребни се понатамошни студии што би покажале дали оваа корелација е валидна.

Високиот број на Т и Б лимфоцити кај *иреверзибилно оштетените пулпини ткива*, споредено со здравите и реверзибилно оштетените, сугерира дека имунокомпетентните клетки имаат важна улога во патогенезата на пулпините заболувања. Кога на овие податоци ќе се додаде и фактот дека кај нив постои екстремно висок број на Б лимфоцити може да се даде објаснување дека хелперните (CD4) лимфоцити имаат регулаторна функција на нивната активност. Зголемувањето на концентрацијата на лимфокините што се ослободуваат од хелперните лимфоцити, во кои се вклучени и оние кои индуцираат зголемена продукција на имуноглобулини од страна на Б клетките, доведува до имунопатолошки промени во пулпите. Со континуиран инфлукс на антигени во нетретирани кариозни лезија се повеќе хелперни (CD4) лимфоцити и Б лимфоцити, стануваат активирани *до степен кога инфламаторниот процес не може да биде софрен* од се помалиот број на супресорни (CD8) лимфоцити.

Во некротичниот стадиум на пулпното заболување, бројот на лимфоцитите како на Т така и на Б лимфоцитите, *драматично се намалува*, така што се случува одумирање на пулпното ткиво.

Резултатите од оваа теза и резултатите од литературата сугерираат дека клеточниот имунолошки одговор од страна на Т клеточната линија се активира во пулпината строма како резултат на кариесот, а продукцијата на антитела кај *caries superficialis* и *caries media*, се случува во локалните лимфни јазали. Од друга страна, хуморалниот имунолошки одговор претставен со Б клетките и продукцијата на антитела кај *caries profunda* и *pulpitite* се случува локално во пулпата.

8.2.3. Дендритични клетки и макрофаги

Покрај веќе опишаните имунокомпетентни клетки, денталната пулпа содржи и такви клетки кои спаѓаат во групата на антиген презентирачки клетки (АПК). Оваа група на клетки заедно ги опфаќа дендритичните клетки и макрофагите. Иако дендритичните клетки обично поседуваат поголема антиген презентирачка способност отколку макрофагите, сепак дендритичните клетки и макрофагите имаат некои заеднички морфолошки и фенотипски карактеристики. *Jontell и сор. (1987)* први известуваат за постоење значителен број на класа II молекули со дендритична морфологија во денталната пулпа.

Морфолошки хетерогени популации на класа II молекули кои експресираат ($OX6^+$) присутни во пулпата, потврдено е со имунохистохемиските студии на здрава дентална пулпа кај луѓе (*Jontell и сор. 1987, Okiji и сор. 1997a*) и стаорци (*Jontell и сор. 1988, Okiji и сор. 1992, Ohshima и сор. 1994*). Овие клетки под светлосен микроскоп можат да имаат различен облик. Врз база на електронско микроскопско испитување најмалку два различни типа на клетки се идентифицирани. Едниот тип е претставен со нагласен дендритичен изглед кој никогаш не содржи типични фагозоми и ги претставува дендритичните клетки. Другата група покажува морфолошки карактеристики слични на тие на макрофагите.

Од резултатите добиени од оваа теза можеме да видиме дека постои релативно мал број на дендритични клетки кај здрави заби (1.11 ± 0.65). Дендритичните клетки се опишуваат како клетки кои експресираат класа II молекули со назначен дендритичен изглед. Тие формираат континуирана ретикуларна мрежа која го опфаќа целото пулпино ткиво и одонтобласниот слој. Овие клетки покажуваат назначена акумулација во периваскуларниот регион во пулпината строма и во параодонтобласниот слој на надворешниот дел од пулпата. Со конфокален ласерски микроскоп е потврдено дека тие што се лоцирани по должината на крвните садови ги допираат клеточните мембрани на ендотелните клетки што укажува на постоење на функционална интеракција меѓу овие клетки. (*Jontell и Bergenholtz 1992, Jontell и сор. 1996, Okiji и сор. 1997a*). Дендритичните клетки се стратешки

лоцирани и во периферијата на пулпата каде е најголема шансата за навлегување на антигени од надвор. Параодонтобластната локализација на пулпините дендритични клетки гледана со конфокален ласерски микроскоп укажува на нивната близина со нервните влакна кои се реактивни на неуропептиди како што се, супстанцијата П и еден пептид кој е генетски сроден со калцитонинот (*Jontell и сор. 1996, Okiji и сор. 1997b*). Овие наоди сугерираат за потенцијалните паракрини и неурокрини интеракции меѓу пулпините дендритични клетки и нервите преку ослободување на имуно-модулаторни неуропептиди од нервните завршоци. Дендритичните клетки имаат важна улога во иницијацијата на примарниот имунолошки одговор, тие го фаќаат антигенот, го обработуваат и мигрираат во регионалните лимфни јазли каде што “созреваат” во зрели антиген презентирачки клетки и го презентираат антигенот на нестимулираните хелперни (*CD4*) Т лимфоцити.

Во здрава пулпа забележавме мал број (2.43 ± 1.01) на резидентни макрофаги (хистиоцити), лоцирани повеќе централно во пулпата строма. Присуството на макрофагите во здрава дентална пулпа е потврдено во бројни испитувања на светлосен и електронски микроскоп (*Seltzer и Bender 1984, Avery и Steele 1992*). Вообичаено, тие имаат облик на издолжени клетки со периваскуларна локализација поради кое тие многу тешко може да се разликуваат од фибробластите ако се гледаат под светлосен микроскоп. Во неодамнешните имунохистохемиски студии, каки и во нашата, се покажа дека клетките кои поседуваат макрофаген фенотип најчесто се распоредени во централните делови на пулпата строма и се сметаат за важни имуни клетки во пулпата. (*Jontell и сор. 1987, Jontell и сор. 1996, Okiji и сор. 1997a*)

Макрофагите исто така спаѓаат во антиген презентирачки клетки. Тие за разлика од дендритичните клетки поседуваат послаб капацитет за стимулирање на Т лимфоцитите и не мигрираат во регионалните лимфни јазли. Ним им е потребен некој вид на активирачки сигнал за да може да ги стимулираат Т лимфоцитите. Така активирани тие секретираат низа активни супстанции што го потенцираат воспалението и може да ги активираат Т лимфоцитите (*Jontell и сор. 1994*).

За разлика од дендритичните клетки, макрофагите можат локално да стапат во реакција со Т лимфоцитите кои “паметат”, и кои патролираат во пулпиното ткиво при секоја секундарна антигена експозиција. Оваа интеракција потоа предизвикува активација на Т лимфоцитите што доведува до потенцирање на имунолошкиот одговор во кој се вклучени и активирани неколку типови на инфламаторни и имунокомпетентни клетки. Макрофагите исто така се вклучени во репараторните процеси на денталната пулпа каде ја потпомагаат неуроваскуларизацијата на раната и фибробластната пролиферација преку продукција на факторите за раст (*Polverini, 1995*).

Истражувањата на клетките кои експресираат класа II молекули (дендритични клетки и макрофаги) покажуваат нивна различна застапеност во пулпата, во зависност од степенот на оштетување на тврдите забни супстанции. Бројот на клетките лесно се зголемува кај *caries superficialis* (2.16 ± 0.67 , односно 6.85 ± 1.67) и *caries media* (5.02 ± 0.47 , односно 25.80 ± 1.11). Со натамошното ширење на кариозната лезија кон пулпата и се поголемо навлегување на бактериските антигени во пулпата нивниот број значително се зголемува кај *caries profunda* (22.10 ± 1.33 , односно 41.70 ± 4.09) за да кај *pulpitis* ги достигне највисоките вредности (39.40 ± 3.44 , односно 69.82 ± 6.80).

Иницијалниот пулпин одговор се карактеризира со локализирана акумулација на дендритични клетки и макрофаги во регијата на пулпиниот крај од дентинските тубули кои комуницираат со раните кариозни лезии. Со прогресијата на кариозната лезија се зголемува и бројот на дендритичните клетки и макрофагите во коронарната пулпа. Нашите наоди во однос на дистрибуцијата и бројот на дендритичните клетки го потврдуваат концептот на *Kamal* и сор. (1997) дека пулпата почнува да реагира на кариозната лезија уште пред да се случи бактериската пенетрација во пулпината комора при што како многу важен елемент за квантитативната акумулација на дендритичните клетки се истакнува нејзината длабочина, а времетраењето е од многу помало значење.

Направени се повеќе студии во кои е испитувана дистрибуцијата на дендритичните (*HLA-DR*) клетки кај заби со различна длабочина на кариозни лезии (*Sakurai* и сор. 1996 и *Yosiba* и сор. 1996). Како и во нашите наоди тие нотирале значајна локализирана акумулација на дендритични клетки во регијата која е непосредно под пулпиниот крај од кариозните дентински тубули. Оваа акумулација покажува дека овие клетки активно одговараат на кариозните бактериски антигени што продираат низ дентинските тубули. Авторите нотирале локализирана акумулација на T (*CD3* позитивни) лимфоцити, во и околу областа на акумулацијата на дендритичните клетки. Тие заклучуваат дека постои локална интеракција меѓу пулпините дендритични клетки и T лимфоцитите кои "паметат". Оваа интеракција резултира со активација на T лимфоцитите и пулпините дендритични клетки кои потоа помагаат во мобилизација и активација на различни типови на ефektorни клетки, со што ќе се откочи каскадата на имунопатолошките настани што се вклучени во процесот на пулпините заболувања кај денталниот кариес.

Кинетиката на дендритичните клетки и макрофагите во однос на состојбата во пулпиното ткиво при прогресијата на кариозната лезија ја испитувал *Izumi* и сор. (1996). Неговите наоди, како и нашите покажуваат дека бројот на дендритичните (анти *HLA-DR* позитивни) клетки драстично

се зголемил со приближувањето на карнозната лезија до пулпата и во експонирана пулпа. Големии број на дендритични клетки, по кое следи значително зголемување на сите други имунокомпетентни клетки во пулпата кај напреднатите стадиуми на карнозната лезија, укажуваат на тоа дека антигената презентација е следена како со клеточено посредувани така и со хуморални имунолошки реакции. Бројот на макрофагите покажува пропорционално зголемување со развојот на карносот. Рапно се зголемува при пулините инфламаторни лезии како резултат на навлегувањето на бактерискиот ендотоксин во пулпата (Bergenholtz и сор. 1991). Овие клетки, всушност се, резидентните макрофаги кои се активираат при инфламаторниот одговор. Макрофагите се вклучени во заштита од оштетување на тквото кое го предизвикуваат протеазите што се ослободуваат од инфламаторните клетки. Нивната заштитна улога ја вклучува и фагоцитозата на токсичните микроорганизми и остатоците од оштетеното тќиво.

Испитувањето на локализацијата и бројот на дендритичните клетки кај нееруптирани заби укажува на фактот дека хуманата дентална пулпа има потенцијал за имунолошка одбрана уште пред да еруптираат забите (Sotirovska-Ivkovska и сор. 2001, Yoshida и сор. 1996). Sakurai и сор. (1999) во својата студија забележуваат дека зголемувањето на бројот на дендритичните клетки било помалку изразено кај карнозните заби со реператорен дентин. Од добиените резултати тие заклучуваат дека дендритичните клетки, како и пулпините нерви реагираат брзо и активно на стимулансите кои доаѓаат од дентинските трубули. Ваква синхронизирана акција на овие две структури сугерира на зголемена можност за неуро-имунолошка интеракција што може да биде од големо значење во модулатијата на патолошките процеси во хуманата дентална пулпа.

Малиот број на дендритични (HLA-DR позитивни) клетки кај здравите заби и кај забите со *caries superficialis* укажува на фактот дека тие имаат способност да мигрираат во регионалните лимфни јазли каде го презентираат антигенот на Т клетките, додека зголемениот број на дендритични клетки со степенот на прогресијата на карнозната лезија сугерира на постоење на зголемена "контрола" од страна на имунолошкиот систем.

Пропорционалното зголемување на бројот на макрофагите со степенот на прогресија на карнозната лезија може да ја објасни нивната фундаментална функција во одржувањето на тќивото материјал како што се микроорганизмите и некротичните тќива, со што тие партиципираат во одбранбените механизми на пулпата кои се јавуваат уште пред да се јави Т клеточно посредуваната амплификација. Понатаму, макрофагите исто така партиципираат во иницијацијата на Т клеточната активација како со обработка така и со презентацијата на

антигенот. Тие имаат централна улога како во имунолошката реакција така и во заштитата на воспалената пулпа кога таа е оштетена од микроорганизми и различни протеази кои се ослободуваат од воспалителните клетки.

Сумирајќи ги сознанијата стекнати преку сопствените истражувања и од литературата можеме да кажеме дека дендритичните клетки и макрофагите партиципираат како во воспоставување на ефикасен имунолошки одговор така и во ткивно-проективните механизми на хуманата дентална пулпа.

Според севкупните сознанија за имунолошкиот одговор на пулпното ткиво, претставен преку имунокомпетентните и антиген-презентирачките клетки во однос на прогресијата на кариозната лезија, имунолошката реакција во пулпата може да се подели во две фази:

- прва фаза или рана - која се јавува кај *caries superficialis* и *caries media*, каде бројот на Т клетките (посебно супресорните CD8 лимфоцити), макрофагите и дендритичните клетки постојано се зголемува и доведува до активирање на *целуларниот имунолошки одговор*.
- втора фаза или најредната - која се јавува кај *caries profunda* и *pulpitot*, каде се забележува зголемување на хелперните (CD4) Т лимфоцити со истовремено зголемување бројот на Б (CD20) лимфоцитите, плазма клетките, гранулоцитите и макрофагите. Во оваа фаза преовладува *хуморалниот имунолошки одговор*.

Нашите наоди упатуваат на тоа дека хуманата дентална пулпа има широк дијапазон на одбранбени реакции од страна на инфламаторните клетки, во кои се вклучени и имунокомпетентните клетки. Меѓутоа, репарација на оштетеното пулпно ткиво манифестирано со фиброза не се случува така лесно како во другите ткива. Адекватното крвоснабдување во регијата на повредата е битен фактор од кој зависи заздравувањето, а една од причините за неуспехот на репарацијата е фактот што пулпата не се снабдува со адекватна количина на крв при потешки оштетувања поради нејзината локализација во ригиден кавитет, крвните садови навлегуваат само преку апикалниот отвор, кој исто така е ригиден. Друга причина за послаб репаративен одговор на пулпното ткиво е помалата метаболичка активност отколку во другите ткива.

Резултатите од истражувањата што се реализирани во рамките на оваа студија допринесуваат за збогатување на сознанијата за биолошките процеси што се одвиваат во текот на одбранбените реакции во пулпата. Нивното познавање е неопходно за практичната работа во областа на детската стоматологија бидејќи врз основа на овие податоците добиени за нив, може:

- да се постави дијагноза и да се одреди адекватен метод на лечење
- да се препостави патогениот фактор и евентуална можност пулпата да го елиминира остоечкиот патолошки процес без ендодонско лечење
- да се процени, дали со достапните конзервативни терапевтски методи може да се обезбеди елиминирање на заочната воспалителна реакција во секоја дадена ситуација посебно
- да се препостави прогноза за евентуалната ендодонска интервенција и врз нејзина основа да се постави индикација за ендодонски третман или за екстракција на заби.

9. ЗАКЛУЧОЦИ

Врз основа на извршените имунохистохемиски, светлосно микроскопски и клинички испитувања на здрави пулпи и пулпи од заби зафатени со различен степен на прогресија на кариозната лезија, може да се донесат следниве заклучоци:

1. Здравата, неинфламирана човечка пулпа е добро адаптирана на својата непосредна околина. Таа поседува доволен број одбранбени клетки кои при афекција на пулпата соодветно одговараат на штетните стимуланси, земајќи учество во одбранбената реакција зависно од нивната специфична функција.
2. Имунокомпетентните и антиген презентирачките клетки покажуваат различна квантитативна застапеност во пулпата на здрави заби и заби со различен степен на оштетување на тврдите забни супстанции.
3. Кај здрави пулпини типично присутни се рејки Т лимфоцити, макрофаги и дендритични клетки при што доминантен клеточен тип се супресорните (CD8) Т лимфоцити, со однос CD4/CD8 од 0.22.
4. Кај *caries superficialis* пулпиното ткиво реагира со фокална акумулација на мононуклеарен воспалителен инфилтрат непосредно под дентинските тубули кои комуницираат со кариозната лезија. Во инфилтратот доминираат Т лимфоцити, се среќаваат ретки макрофаги, дендритични клетки, како и многу ретки Б лимфоцити со однос Б/Т од 0.21.
5. Почетните воспалителни промени во пулпиното ткиво се јавуваат кај *caries superficialis*, поради што истиот треба навреме конзервативно да биде саниран за да се спречи понатамошното оштетување на пулпата.
6. Кај *caries media* реакцијата на пулпата е поинтензивно изразена преку зголемена фокална акумулација на мононуклеарен воспалителен инфилтрат. Притоа е задржан односот помеѓу CD4/CD8 Т лимфоцитите од 0.23, а односот помеѓу Б/Т лимфоцитите е 0.24 следено со позначајна локална акумулација на макрофагите.

7. Кај *caries profunda* драстично е зголемен бројот на сите анализирани воспалителни и имунокомпетентни клетки со значителен пораст на Б лимфоцитите.
8. Кај *caries profunda* се уште преовладуваат Т лимфоцитите, со однос Б/Т лимфоцити од 0.57 што укажува на реверзибилноста на промените во пулпата.
9. Кај пулпите со реверзибилно оштетување, околу 60% на лимфоцитната популација се Т лимфоцити со предоминантно присуство на супресорните (CD8) Т лимфоцити, со однос CD4/CD8 од 0.84.
10. Кај реверзибилно пулпно оштетување и зголемениот целуларен и хуморален имунолошки одговор, понатамошното ткивно разградување треба да биде превенирано со превземањето на адекватен конзервативен третман.
11. Кај *pulpitis* бројот на сите воспалителни и имунокомпетентни клетки е еноормно зголемен со преминација на Б клеточната популација и однос Б/Т од 1.81
12. Кај иреверзибилно оштетување пулпи покрај присуството на поголем број Б лимфоцити, детектиран е и зголемен број на хелперните Т лимфоцити. Односот помеѓу хелперните и супресорните лимфоцити (CD4/CD8) изнесува 1.22.
13. Сите пулпини ткива зафатени со иреверзибилно оштетување покажуваат фокуси на јака воспалителна инфилтрација, како и формирање на апсцеси и/или некротични области.
14. Дендритичните клетки од хуманата дентална пулпа се од примарна важност во раниите стадиуми од пулпиниот имунолошки одговор, додека макрофагите имаат значајна улога во неговите подоцнежни фази.
15. Дендритичните клетки и макрофагите партиципираат како во создавањето на ефикасен имунолошки одговор така и во ткивно-процесивните механизми на хуманата дентална пулпа.
16. Резултатите од оваа теза го подржуваат концептот дека раниот третман на кариозната лезија претставува биолошки рационален пристап со што се спречува состојбата која го надминува природниот

одбранбен потенцијал на пулпата во справувањето со антигените од кариозната лезија.

17. Промените кои се јавуваат во забната пулпа како резултат на кариесот на тврдите забни супстанции се значајни. Со превенцијата на пулпално оштетување се одбегнува потребата од ендодонтска терапија и екстензивни реставрации.

10. ИДНИ ПЕРСПЕКТИВИ ВО ИСТРАЖУВАЊАТА НА ЗАБОЛУВАЊАТА НА ПУЛПАТА

Поради својата специфична структурна организација, денталната пулпа претставува уникатен модел за проучување на меѓусебната поврзаност и комуникација помеѓу имуните клетки, крвните садови и нервните влакна. Сегашното познавање на пулпо-дентинскиот комплекс овозможува извонреден терен за интердисциплинарни истражувања кои можат да го продлабочат нашето познавање за начинот на кој функционира овој орган во патофизиолошки услови.

Напорите на идните истражувања треба да бидат насочени кон многу поопсежни испитувања на имунолошкиот феномен кој се јавува при пулпното и периапикалното воспаление. Повеќе не може да се прифати тврдењето дека воспалението на пулпата (*pulpitis*) е само неспецифичен воспалителен одговор кој се јавува како реакција на иритаторот.

Улогата на клеточно посредуваниот и хуморалниот имунолошки одговор мора понатаму да биде истражуван во уште повеќе детали. Улогата на микроорганизмите и нивните продукти како антигени, формирањето на “ендогените антигени” што се добиваат од продуктите на воспалителниот одговор, улогата на *комплементот*, ослободувањето на *лизозомалните ензими* од страна на полиморфонуклеарните леукоцити и макрофагите, улогата на *хемиските медијатори*, *просјангланините* и *цикличните нуклеотиди* исто така мора понатаму да се разјаснува.

Не од помало значење се и понатамошните испитувања на *неуроимунолошката интеракција* за која во најновите студии се укажува на тоа дека игра важна улога во модулацијата на имунолошкиот одговор од пулпо-дентинскиот комплекс. Се повеќе дознаваме за развојот на имунолошкиот одговор, меѓутоа испитувањата треба да се насочат кон точно утврдување на тоа како започнува имунолошкиот одговор, преку комуникацијата на *нервоваскуларните дендритични клетки* со нервниот систем. Индиректно, овие клетки учествуваат и во “*регруирањето*” на воспалителни клетки преку праќање на сигнали до ендотелните клетки на капиларните крвни садови.

Потребни се и понатамошни испитувања на комуникациската поврзаност помеѓу биолошките системи кои се вклучени во одбраната на пулпата и нејзината репарација. Можеби промените во васкуларната пермеабилност и индукцијата на адхезивните молекули што се јавуваат преку директна комуникација на нервните клетки со ендотелните клетки, може да ги прошират нашите сознанија за регулаторната улога која ја имаат имунокомпетентните клетки. Меѓутоа, очигледно е дека се уште недостасуваат информации за точно да се разбере како различните

ткивни структури соработуваат за да овозможат одбрана и репарација во пулпо-дентинскиот комплекс. Само тогаш ќе добиеме појасна слика за севкупниот имунолошки одговор на пулпиното ткиво за неговиот почеток, развој и исход од кој понатаму може да се осознаат можностите за негова евентуална контрола.

11. ЛИТЕРАТУРА :

1. Ackermans F, Klein JP, Frank RM: **Ultrastructural localisation of immunoglobulins in carious human dentine.** *Arch Oral Biol* 26: 879 - 886, 1981
2. Avery JK: **Dentin** In: Bhaskarn SN, ed: **Orban's oral histology and embryology.** eds 9, St. Louis C.V, Mosby 1980
3. Avery JK: **Repair potential of the pulp.** *J Endod* 7(5): 205-212, 1981
4. Avery JK, Steele PF: **Essentials of oral histology and embryology. A clinical approach.** Mosby-Year Book, Inc. 1992
5. Bahn A: **Microbiology and immunopathology of pulpal and periapical infections. Part I.** *The Compendium of Continuing Education* 5(10): 840-864, 1984
6. Baume LJ: **Dental pulp conditions in relation to carious lesions.** *Int Dent J* 20: 309-337, 1970
7. Bergenholtz G, Lindhe J: **Effect of soluble plaque factors on inflammatory reactions in the dental pulp.** *Scand J Dent Res* 83: 153 - 158, 1975
8. Bergenholtz G: **Effect of bacterial products on inflammatory reactions in the dental pulp.** *Scand J Dent Res* 84: 122 - 129, 1977
9. Bergenholtz G: **Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation.** *J Endod* 7(3): 100 - 104, 1981
10. Bergengoltz G, Warfvinge J: **Migration of leucocytes in dental pulp in response to plaque bacteria.** *Scand J Dent Res* 90: 354 - 362, 1982
11. Bergenholtz G: **Pathogenic mechanisms in the pulpal disease.** *J Endod* 16(2): 98 - 101, 1990
12. Bergenholtz G, Nagaoka S, Jontell M: **Class II antigen expressing cells in experimentally induced pulpitis.** *Int Endod J* 24: 8-14, 1991
13. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ: **A colour atlas and textbook of oral anatomy, histology and embryology.** 2nd edn, Wolfe Publishing Ltd., 1992
14. Bernick S: **Morphological changes to lymphatic vessels in pulpal inflammation.** *J Dent Res* 56(7): 841-849, 1977
15. Bjorndal L, Thylstrup A: **A comparative histologic study of the pulp-dentinal interface in undemineralized and demineralized tooth section.** *Acta Odontol Scand* 52: 198-202, 1994
16. Bjorndal L, Darvann T, Thylstrup A: **A quantitative light microscopic study of the odontoblast and subodontoblastic reactions to active and arrested enamel caries without cavitation.** *Caries Res* 32: 59-69, 1998
17. Brannstrom M, Lind PO: **Pulpal response to early dental caries.** *J Dent Res* 44: 1045-1050, 1965
18. Brannstrom M, Garberoglio R: **The dentinal tubules and the odontoblast processes.** *Acta Odotol Scand* 30:291, 1972
19. Burne RA: **Oral streptococci: Products of their environment.** *J Dent Res* 77 (3): 445-452, 1998

20. Butler WT: **Dentin collagen:chemical structure and role in mineralization.** In: Linde A. (ed): *Dentin and Dentinogenesis*, Boca Raton, CRC Press: 37-54 vol II, 1984
21. Butler WT, et al: **Recent investigation on dentin specific proteins.** *Proc Finn Dent Soc* 88 (Suppl 1): 369, 1992
22. Byers M, Taylor P, Khayat B, Kimberly CL: **Effects of injury and inflammation on pulpal and periapical nerves.** *J Endod* 16(2): 78 - 83, 1990
23. Cox DS: **Inflammation, hypersensitivity, and regulatory mediators.** In: *Contemporary oral microbiology and immunology.* Slots J, Taubman MA (eds), Chapter 9, pp 135-143, Mosby, Baltimore, 1992
24. Dabelin GJ, Olsen I, Tronstas L: **Profiling of *Propionibacterium acnes* recovered from root canal and blood during and after endodontic treatment.** *Endod Dent Traumatol* 8: 248, 1991
25. de Soet JJ, van Dalen PJ, Russel RRB, de Graaf J: **Identification of mutans streptococci with monoclonal antibodies.** *Antonie van Leeuwenhoek* 58: 219-225, 1990
26. Duchin S, Van Houte J: **Relationship of *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli* to incipient smooth surface dental caries in man.** *Arch Oral Biol* 23:779-786, 1978
27. Ebersole JL: **Cells and tissues of the immune system.** In: *Contemporary oral microbiology and immunology.* Slots J, Taubman MA(eds), Chapter 6, pp 78-116, Mosby, Baltimore, 1992
28. Edwardsson S: **Bacteriology of dentin caries.** In: *Dentine and dentine reactions in the oral cavity.* Thylstrup A, Leach SA and Qvist V(eds) pp. 95-102, IRL Press Ltd Oxford, 1987
29. Eidelman E, Ulmanky M, Michaeli Y: **Histopathology of the pulp in primary incisors with dentinal caries.** *Pediatr Dent* 14: 1372-1375, 1992
30. Falkler Jr WA, Martin SA, Tolba M, Siegel MA, Mackler BF: **Reaction of pulpal immunoglobulins to oral microorganisms by an enzyme-linked immunoadsorbent assay.** *J Endod* 13(6): 260-266, 1987
31. Farnoush A: **Mast cells in human dental pulp.** *J Endod* 10: 250-252, 1984
32. Figures KH, Douglas CWI: **Actinomyces associated with a root-treated tooth: report of a case.** *Int Endod J* 24: 326, 1991
33. Fleming S : **Immunophysiology : the Immune Response.** In: *Muir's Textbook of Pathology.* Anderson J R(ed) ,12th edn, 6.1-6.40. Arnold, Baltimore, 1985
34. Fusayama T, Okuse K, Hosoda H: **Relationship between hardness, discoloration, and microbial invasion in carious dentin.** *J Dent Res* 45: 1033-1046, 1966
35. Gatter KC, Falini B, Mason DY: **The use of monoclonal antibodies in histopathological diagnosis.** In: *Monoclonal antibodies against bacteria..* MacarioAJL and deMacario EC(eds) Chap 3, pp 35-67, Academic Press Inc. London,1985

36. Gazi MI: **Monoclonal antibodies in dentistry.** *Br Dent J* 161: 399-405, 1986
37. Gregoire G, Terrie B: **Identification of lymphocyte antigens in human dental pulps.** *J Oral Pathol Med* 19:246-50, 1990
38. Hahn CL, Falkler WA Jr, Siegel MA: **A study of T and B cells in pulpal pathosis.** *J Endod* 15(1): 20 -29, 1989
39. Hahn CL, Falker Jr A, Minah GE: **Microbiological studies of carious dentine from human teeth with irreversible pulpitis.** *Arch Oral Biol* 36 (2), 147-153, 1991
40. Hahn CL, Falkler WA Jr: **Antibodies in normal and diseased pulps reactive with microorganisms isolated from deep caries.** *J Endod* 18: 28 - 31, 1992
41. Hahn CL, Overton B: **The effects of immunoglobulins on the connective permeability of human dentine in vitro.** *Arch Oral Biol* 42(16): 835-843, 1997
42. Hall RC, Embery G: **The use of immunohistochemistry in understanding the structure and function of the extracellular matrix of dental tissues.** *Adv Dent Res* 11(4):478-486, 1997
43. Heide S, Mjor IA: **Pulp reactions to experimental exposures in young permanent monkey teeth.** *Int Endod J* 16: 11-19, 1983
44. Hoshino E et al.: **Bacterial invasion of non-exposed dental pulp.** *Int Endod J* 25: 2-5, 1992
45. Inoue H, Kurosaka Y, Abe K: **Autonomic nerve endings in the odontoblast/predentin border and predentin of the canine teeth of dogs.** *J Endodon* 18:149, 1992
46. Izumi T, Kobayashi I, Okamura K, Sakai H: **Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-carious and carious teeth.** *Arch Oral Biol* 40(7): 609 - 614, 1995
47. Izumi T, Kobayashi I, Okamura K, Matsuo K, Kiyoshima T, Ishibashi Y, Inoue H, Sakai H: **An immunohistochemical study of HLA-DR and α_1 -antichymotrypsin-positive cells in the pulp of human non-carious and carious teeth.** *Arch Oral Biol* 41(7): 627-630, 1996
48. Jontell M, Gunraj MN, Bergenholtz G: **Immunocompetent cells in the dental pulp.** *J Dent Res* 66(6): 1149 - 1153, 1987
49. Jontell M, Bergenholtz G, Scheynius A, Ambrose W: **Dendritic cells and Macrophages expressing class II antigens in the normal rat incisor pulp.** *J Dent Res* 67(10): 1263 - 1266, 1988
50. Jontell M, Bergenholtz G: **Accessory cells in the immune defence of the dental pulp.** *Proc Finn Dent Soc* 88(suppl.1):345-56, 1992
51. Jontell M, Eklog C, Dahlgren UI, Bergenholtz G: **Difference in capacity between macrophages and dendritic cells from rat incisor pulp to provide accessory signals to concavalin-A-stimulated T-lymphocytes.** *J Dent Res* 73(5): 1056-1060, 1994

52. Jontell M, Okiji T, Dahlgreen U, bergenholtz G: **Interaction between perivasular dendritic cells, neuropeptides and endotelial cells in the dental pulp.** In: Proceedings of the Internacional Conference on *Dentin/pulp complex* 1995 and the International Meeting on Clinical Topics of Dentin/Pulp Complex. Shimono M, Maeda T, Suda H, Takahashi K,(ed) Tokyo: *Quintessence*, pp.182-187, 1996
53. Jontell M, Okiji T, Dahlgreen U, Bergenholtz G: **Immune defence mechanisms of the dental pulp.** *Crit Rev Oral Biol Med* 9(2):179-200,1998
54. Kamal AMM, Okiji T, Kawashima N, Suda N: **Defence responses of dentin/pulp complex experimentally induced caries in rat molars: An immunohistochemical study on kinetics of pulpal Ia antigen-expressing cells and macrophages.** *J Endod* 23(2), 115 - 120, 1997
55. Katterring JD, Torabinejad M: **Microbiology and Immunology.** In: *Pathways of the pulp.* Cohen S and Burns RC(eds), 7th edn, Chap13, pp.463-475, Mosby, Baltimore, 1998
56. Kim S, Schuessler G, Chien S: **Measurement of blood flow in the dental pulp of the dogs with the ¹³³xenon washed method.** *Arch Oral Biol* 28:501, 1983
57. Kim S: **Neurovascular interactions in the dental pulp in health and inflammation.** *J Endod* 14: 48, 1990
58. Kim S, Trowbridge HO: **Pulpal reaction to caries and dental procedures.** In: *Pathways of the pulp.* Cohen S and Burns RC(eds), 7th edn, Chap 15, pp. 414 - 434, Mosby, Baltimore, 1998
59. Kim S, Trowbridge HO: **Pulp development, structure and function.** In: *Pathways of the pulp.* Cohen S and Burns RC(eds), 7th edn, Chap 11, pp. 532 - 551, Mosby, Baltimore, 1998
60. Kobayashi I, Izumi T, Okamura K, Matsuo K, Ishibashi Y, Sakai H: **Biological behavior of human dental pulp cells in response to carious stimuli analyzed by PCNA immunostaining and AgNOR staining.** *Caries Res* 30: 225-230, 1996
61. Kogushi M, Nakamura S, Kishi Y, Kim, Takahashi K: **A study of leukocyte extravasation in early inflammatory changes in the pulp.** *J Endod* 14(10): 475-481, 1988
62. Kumar V, Cotran R, Robbins SL: **Basic pathology.** 5thedn. Chap. 2, pp. 25-46. Saunders, Piladelphia, 1992
63. Kuramitsu H: **Molecular biology of Streptococcus mutans virulence.** In: *Cariology of the nineties.* Bowen WH and Tabak LA(eds) pp.301-308, University of Rochester,1993
64. Langeland K: **Management of the inflamed pulp associated with deep carious lesion.** *J Endod* 7(4): 169 - 181, 1981
65. Langeland K: **Tissue response to dental caries.** *Endod Dent Traumatol* 3: 149 - 71, 1987
66. Larmas M: **Response of pulpo-dentinal complex to caries attack.** *Proc Finn Dent Soc* 82: 298 - 304, 1986

67. Lehner T: **Immunology of oral diseases. 3rd edn. Chap. 4**, pp. 28-47, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1992
68. Lehner T: **Immunology of oral diseases. 3rd edn. Chap. 6**, pp. 68-101, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1992
69. Lilja T: **Innervation of different parts of predentin and dentin in young human premolars. Acta Odont Scand 37**: 339, 1979
70. Lin L, Langeland K: **Light and electron microscopic study of teeth with carious pulp exposures. Oral Surg 51(3)**: 292 - 316, 1981
71. Mackay GS: **The histology and microbiology of acute occlusal dentine lesions in human permanent molar teeth. Arch Oral Biol 21**: 51-66, 1976
72. Magloire H, Joffre A, Bleicher F: **An in vitro model of human dental pulp repair. J Dent Res 75(12)**: 1971-1978, 1996
73. Mangkornkarn C, Steiner JC, Bohman R, Lindemann RA: **Flow cytometric analysis of human dental pulp tissue. J Endodont 17**: 49-53, 1991
74. Massler M: **Pulpal reactions to dental caries. Int. Dent. J. 17(2)**: 441-460, 1967
75. Massler M, Pawlak J: **The affected and infected pulp. Oral Surg 43(6)**: 929 - 947, 1977
76. Matthews B, Vongsavan N: **Interactions between neural and hydrodynamic mechanisms in dentine and pulp. Arch Oral Biol 39 (Suppl)**: 87S-95S, 1994
77. McCalahan SB, Turner DW, kaminski EJ, Osetek EM, Heuer MA: **Natural modifiers of the inflammatory process in the human dental pulp. J Endodont 17(12)**: 589-593, 1991
78. Mendes BRN, Darling AI: **A scanning electron microscope and microradiographic study of closure of human coronal dentinal tubules related to occlusal attrition and caries. Arch Oral Biol 24**: 725, 1979
79. Meryon AD, Jakeman KJ, Browne RM: **Penetration in vitro of human and ferret dentine by three bacterial species in relation to their potential role in pulpal inflammation. Int Endodont J 19**: 213-220, 1986
80. Miler GA, Sternberg RN, Piliero SJ, Rosenberg PA: **Histologic identification of mast cells in human dental pulp. Oral Surg 46**: 559-556, 1978
81. Mjor IA: **Dentine and the pulp. In: Reaction patterns in human teeth. Mjor JA (ed) Boca Raton: CRC Press: 63-156**, 1983
82. Nagaoka S, Miyazaki Y, Lui HJ, Iwamoto Y, Kitano M, Kawagoe M: **Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. J Endodont 21(2)**: 70-73, 1995
83. Naidorf IJ: **Correlation of the inflammatory response with immunological and clinical events. J Endodont 3(6)**: 223 - 228, 1977
84. Nakane A, Yoshida T, Nakata K, Horiba N, Nakamura H: **Effects of lipopolysaccharides on human dental pulp cells. J Endodont 21(3)**: 128-130, 1995

85. Nakanishi T, Matsuo T, Ebisu S: **Quantitative analysis of immunoglobulins and inflammatory factors in human pulpal blood from exposed pulps.** *J Endod* 21(3): 131-136, 1995
86. Newburn E: **Cariology.** 3rd edn, Chap 7, pp. 245-272, Quintessence Publishing Co, Inc, 1989
87. Nissan R, Segal H, Pashley D, Stevens R, Towbridge H: **Ability of bacterial endotoxin to diffuse through human dentin.** *J Endod* 21(2): 62 - 64, 1995
88. Ohshima H et al: **An immunohistochemical study of the distribution of immunocompetent cells, especially macrophages and Ia antigen-expressing cells of heterogenous populations, in normal rat molar pulp.** *J Dent Res* 71: 1196-1202, 1992
89. Ohshima H, Kawahara I, Maeda T, Takano Y: **The relationship between odontoblasts and immunocompetent cells during dentinogenesis in rat incisors: an immunohistochemical study using OX6-monoclonal antibody.** *Arch Histol Cytol* 57:435-447, 1994
90. Okamura K, Tsubakimoto k, Uobe K, Nishida K, Tsutsi M: **Serum proteins and secretory component in human carious dentin.** *J Dent Res* 58(3): 1127-1133, 1979
91. Okamura K, Maeda M, Nishikwa T, Tsutsui M: **Dentinal Response against carious invasion: Localisation of antibodies in odontoblastic body and process.** *J Dent Res* 59(8): 1368 - 1373, 1980
92. Okamura K: **Histological study on the origin of dentinal immunoglobulins and the change in their localisation during caries.** *J Oral Pathol* 14: 680 - 689, 1985
93. Okamura K, Kobayashi I, Matsuo K, Taniguchi K, Ishibashi Y, Izumi T, Kitamura K, Sakai H: **An immunohistochemical and ultrastructural study of vasomotor nerves in the microvasculature of the human dental pulp.** *Arch Oral Biol* 40 (1): 47-53, 1995
94. Okiji T, Kawashima N, Kosaka T, Matsumoto A, Kobayashi C, Suda H: **An immunohistochemical study of the distribution of immunocompetent cells, especially macrophages and Ia antigen-expressing cells of heterogenous populations, in normal rat molar pulp.** *J Dent Res* 71(5):1196-1202, 1992
95. Okiji T, Kosaka, Kamal AMM, Kawashima N, Suda H: **Age-related changes in the immunoreactivity of the monocyte/macrophage system in rat molar pulp.** *Arch Oral Biol* 41:453-460, 1996
96. Okiji T, Jontell M, Belichenko P, Bergenholtz G, Dahlstrom A: **Perivascular dendritic cells of the human dental pulp.** *Acta Physiol Scand* 159: 163-169, 1997a
97. Okiji T, Jontell M, Belichenko P, Dahlgren U, Bergenholtz G, Dahlstrom A: **Structural and functional association between substance P and Calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerves and accessory cells in the rat dental pulp.** *J Dent Res* 76 (12):1818-1824, 1997b

98. Оцаклиевска С: **Проценка на реактивната и реверзибилната способност на забната пулпа при цариес профунда цомплицата.** (Докторска дисертација), Скопје, Стоматолошки факултет, 1990
99. Parfitt GJ. **The speed of development of the carious cavity.** *Brit Dent J* 100: 204-207, 1956
100. Pashley DH. **Dentine permeability and its role in the pathobiology of dentine sensitivity.** *Arch Oral Biol* 49 (Suppl): 73S-80S, 1994
101. Paterson RC: **Bacterial contamination and the exposed pulp.** *Brit Dent J* 140: 231-236, 1976
102. Paterson RC, Poutney SK: **Pulp response to dental caries induced by Streptococcus mutans.** *Oral Surg* 533(1), 88-92, 1982
103. Paterson RC, Poutney SK: **Pulp response to and cariogenicity of Lactobacillus casei in monoinfected gnotobiotic rats.** *Oral Surg* 64: 611-624, 1987
104. Paterson RC, Poutney SK: **Pulp response to Streptococcus mutans.** *Oral Surg* 64: 339-347, 1987
105. Paterson RC, Poutney SK: **The response of the dental pulp to mechanical exposure in gnotobiotic rats mono-infected with a strain of Streptococcus mutans.** *Int Endod J* 20, 159-168, 1987
106. Paterson RC, Watts A: **Further studies on the exposed germ-free dental pulp.** *Int Endod J* 20:112-121, 1987
107. Paterson RC, Watts A: **Pulp response to, and cariogenicity of, a strain of Streptococcus mutans.** *Int Endod J* 22, 1-8, 1989
108. Paterson RC, Watts A: **Pulp response to two strains of bacteria isolated from human carious dentine (L. plantarum) (NCTC 1406) and S. mutans (NCTC 10919).** *Int Endod J* 25, 134-141, 1992
109. Pekovic DD, Fillery E: **Identification of bacteria in immunopathologic mechanisms of human dental pulp.** *Oral Surg* 57: 652 - 661, 1984
110. Pekovic DD, Shapiro A, Gornitsky M: **Identification of bacteria in association with immune components in human carious dentin.** *Oral Pathol* 16: 223-233, 1987
111. Pekovic DD, Adamkivic VW, Gornitsky M: **Immunoglobulins in human dental caries.** *Arch Oral Biol* 33:135-141, 1988
112. Piskin B, Aktner BO, Karakisi H: **Neural changes in ulcerative and hyperplastic pulpitis: a transmission electron microscopic study.** *Int Endod J* 26: 234-240, 1993
113. Pissiotis E, Spanberg LSW: **Toxicity of sonicated extracts of bacteroides gingivalis on human pulpal cells and L929 cells in vitro.** *J Endod* 17(11): 553-560, 1991
114. Polverini PJ: **The pathophysiology of angiogenesis.** *Crit Rev Oral Biol Med* 6:230-247, 1995

115. Pulver WN, Taubman MA, Smith DJ: **Immune components in normal and inflamed human dental pulp.** *Arch Oral Biol* 22: 103 - 111, 1977
116. Pulver WN, Taubman MA, Smith DJ: **Immune components in human dental periapical lesions.** *Arch Oral Biol* 23: 435-443, 1978
117. Ramchandran PN: **Neural elements in dental pulp and dentin.** *Oral Surg* 80(6): 710-719, 1995
118. Rauschenberger CR, Turner DW, Kaminski EJ, Osetek Em: **Human polymorphonuclear granule components: Relative levels detected by a modified enzyme-linked immunoadsorbent assay in normal and inflamed dental pulps.** *J Endod* 17(11): 531-536, 1991
119. Rauschenberger CR, Bailey JC, Cootauco CJ: **Detection of human IL-2 in normal and inflamed dental pulps.** *J Endod* 23(6): 366-370, 1997
120. Reeves R, Stanley HR: **The relationship of bacterial penetration and pulpal pathosis in carious teeth.** *Oral Surg* 22: 59-65, 1966
121. Reyner JA, Southam JC: **Pulp changes in deciduous teeth associated with deep carious dentine.** *J Dent* 7(1): 39-42, 1979
122. Rook G: **Cell mediated immune reactions.** In: *Immunology.* Roitt IM, Brostoff J and Male DK(eds), 3rd Edn, pp. 8.1-8.15. Mosby, Baltimore, 1993
123. Sakamoto M, Sanjo D: **An immunohistochemical study on human dental pulp in different depth of carious lesion.** *Jpn J Conser Dent* 35: 828-835, 1992
124. Sakurai K, Okiji T, Kawashima N, Suda H: **Distribution of pulpal immunocompetent cells and nerves in human carious teeth (abstract).** *J Dent Res* 75(Spec iss) :162, 1996
125. Sakurai K, Okiji T, Suda H: **Co-increase of nerve fibers and HLA-DR-and/or factor-XIIIa-expressing dendritic cells in dentinal caries-affected regions of the human dental pulp: An immunohistochemical study.** *J Dent Res* 78(10):1596-1608,1999
126. Seltzer S, Bender IB, Ziontz M: **The dynamics of pulp inflammation: correlations between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp.** *Oral Surg* 16(7): 846-871, 1966
127. Seltzer S: **Discussion of the vascular permeability and other factors in the modulation of the inflammatory response.** *J Endod* 3(6): 214 - 217, 1977
128. Seltzer S, Bender IB: **The dental pulp: biologic considerations in dental practice.** 3rd ed., Philadelphia: J.B. Lippincott Co., p 96, 1984
129. Shaw S: **Third International Workshop on human leukocyte differentiation antigens.** *Immunol Today* 8:1, 1987
130. Smulson MH, Sieraski SM: **Histopathology and diseases of the dental pulp.** In: *Endodontic therapy.* Weine FS(ed), 4th edn, Chap 3, pp 74 - 153, Mosby, Baltimore, 1989
131. Soames JV, Southam JC: **Oral pathology.** 2nd edn, Oxford University Press, 1993

132. Сотировска-Ивковска А, Бајрактарова Б, Ивковски Љ: **Имунокомпетентни клетки во здрава пулпа : имунохистохемиска студија.** *Мак Стоматолог Преглед* 21(3-4): 79-83, 1997
133. Sotirovska-Ivkovska A, Ivkovski L, Bajraktarova B, Georgiev Z: **Defence responses of the human dental pulp in caries superficialis and caries media.** *4th Congress of the Balkan Stomatological Society (Proceedings)*. pp. 172 Istanbul: Balkan Stomatological Society, 1999
134. Sotirovska-Ivkovska A, Bajraktarova B, Georgiev Z, Zabokova-Bilbilova E: **An immunohistochemical study of antigen-presenting cells in the human dental pulp.** *Int Dent J (Supplement)* 6: 353, 2000
135. Sotirovska-Ivkovska A, Ivkovski L: **Immunohistochemical study of HLA-DR-positive cells and macrophages in unerupted and erupted normal and carious human teeth.** *Caries Res* 35(4): 284, 2001
136. Spector WG: **Chronic inflammation.** *J Endod* 3(6): 218 - 222, 1977
137. Speer ML, Madonia JV, Heuer MA: **Quantitative evaluation of the immunocompetence of the dental pulp.** *J Endod* 3(11): 418 - 423, 1977
138. Stanley HR, Weaver K: **A technique for the preparation of human pulpal tissues.** In: *Biology of the dental pulp organ: A symposium*. Finn SB(ed), Part one, pp 1 - 25, 1968
139. Stanley HR, Gainesville F: **Importance of leukocyte to dental and pulpal health.** *J Endod* 3(9): 334-341, 1977
140. Stanley HR, Premeira JC, Spiegel E, Broom C, Schultz M: **The detection and prevalence of reactive and physiologic sclerotic dentin, reparative dentin and dead tracts beneath various types of dentinal lesions according to tooth surface and age.** *J Path* 12: 257-89, 1983
141. Stashenko P: **Immunology: Introduction and general concepts.** In: *Contemporary oral microbiology and immunology*. Slots J, Taubman MA(eds), Chap 5, pp 69-77, Mosby, Baltimore, 1992
142. Stashenko P: **Immunological aspects of pulpal infection.** In: *Contemporary oral microbiology and immunology*. Slots J, Taubman MA(eds), Chap 31, pp 555-560, Mosby, Baltimore, 1992
143. Стевановиќ М: **Аспекти на реакции на пулпо-дентинскиот орган при некомплицирани кариозни лезии и проценка на нивната реверзибилност.** (Докторска дисертација), Скопје, Стоматолошки факултет, 1991
144. Stephen K: **Caries in young populations-worldwide.** In: *Cariology of the nineties*. Bowen WH and Tabak LA(eds) pp. 37-50, University of Rochester, 1993
145. Sumitani M, Takeuchi H, Shimahara T, Tsubakimoto K, Tsutsu M: **Salivary, Serum, and Microbial Components of human carious dentin.** *J Dent Res* 51(4): 1067-1070, 1972

146. Takahashi K: **Changes in the pulpal vasculature during inflammation.** *J Endod* 16(2): 92 - 97, 1990
147. Tamura M, Nagaoka S, Kawagoe M: **Interleukin-1 α stimulates interstitial collagenase gene expression in human dental pulp fibroblast.** *J Endod* 22(5): 240-243, 1996
148. Taubman MA: **Immunological aspects of dental caries.** In: *Contemporary oral microbiology and immunology.* Slots J, Taubman MA (eds), Chapter 29, pp 533-541, Mosby, Baltimore, 1992.
149. Taylor CR, Tandon A: **Theoretical and practical aspects of the different immunoperoxidase techniques.** In: *Immunomicroscopy: A diagnostic tool for the surgical pathologist.* Cote RJ (ed), 2nd edn, Chap 2, pp 21 - 69, WB Saunders Company, 1994
150. Thomas M, Leaver G: **Short communications: Identification and estimation of plasma proteins in human dentine.** *Arch Oral Biol* 20: 217-218, 1975
151. Thomas HF: **The extent of the odontoblast process in human dentin.** *J Dent Res* 58(D) 2207, 1979
152. Qvist V: **Principal enamel and dentine reactions during caries progression.** In: *Dentine and dentine reactions in the oral cavity.* Thylstrup A, Leach SA and Qvist V(eds) pp. 3-16, IRL Press Ltd (Oxford), 1987
153. Thylstrup HF, Fejerskov O: **Textbook of clinical cariology.** 2nd edn. Chap 6, pp 111- 157, Munsgaard, Kopenhagen, 1994
154. Thylstrup BL: **A structural analysis of approximal enamel caries lesions and subjacent dentin reactions.** *Eur J Oral Sci* 103: 25-31, 1995
155. Toda T, Yoshida M, Ikenaga H: **Bacteriological studies of pulp tissues and root canals after pulpectomy.** *Dentistry in Japan* 33: 50-54, 1997
156. Tonder KJH: **Vascular reactions in the dental pulp during inflammation.** *Acta Odont Scand* 41: 247-256, 1983
157. Torabinejad M: **Mediators of acute and chronic periradicular lesions.** *Oral Surg* 78: 511, 1994
158. Torabinejad M, Walton RE: **Pulp and periradicular pathosis.** In: *Principles and practice of Endodontics.* Walton RE, Torabinejad M (eds), 2nd edn, Chap 3, pp 29 - 51, WB Saunders Company, 1996
159. Torneck CD: **Changes in the fine structure of the dental pulp in human caries pulpitis. I. Nerves and blood vessels.** *J Oral Pathol* 3: 71 - 82, 1974
160. Torneck CD: **Changes in the fine structure of the dental pulp in human caries pulpitis: II: Inflammatory infiltration.** *J Oral Pathol* 3: 83 - 99, 1974
161. Torneck CD: **Changes in the fine structure of the human dental pulp subsequent to carious exposure.** *J Oral Pathol* 6: 82 - 95, 1977
162. Torneck CD: **A report of studies into changes in the fine structure of the dental pulp in human caries pulpitis.** *J Endod* 7(1): 8 - 16, 1981

163. Torneck CD, Torabinejad M: **Biology of the dental pulp and periradicular tissues.** In: *Principles and practice of Endodontics.* Walton RE, Torabinejad M (eds), 2nd edn, Chap 2, pp 6 - 28, WB Saunders Company, 1996
164. Trondstat L: **Recent development in endodontic research.** *Scand J Dent Res* 100:52, 1992
165. Trowbridge HO: **Pathogenesis of pulpitis resulting from dental caries.** *J Endod* 7(2): 52 - 60, 1981
166. Trowbridge HO: **Immunological aspects of chronic inflammation and repair.** *J Endod* 16(2): 54 - 61, 1990
167. Trowbridge HO, Kim S: **Pulp development, structure and function.** In: *Pathways of the pulp.* Cohen S, Burns RC (eds), 7th edn, Chap. 11, pp. 386 - 424. Mosby, Baltimore, 1998
168. Vojinovic O, Stevanovic R, Vojinovic J: **Bioloski osnovi u endodontskom lecenju zuba sa nezavršenim rastom korena.** IP Nauka, Beograd, 1997
169. Warfvinge J, Dahlen G, Bergenholtz G: **Dental pulp response to bacterial cell wall material.** *J Dent Res* 64(8): 1046 - 1050, 1985
170. Watts A, Paterson RC: **Detection of bacteria in histological sections of the dental pulp.** *Int Endod J* 23: 1 - 12, 1990
171. Watts A, Paterson RC: **Pulp response to, and cariogenicity of, a further strain of *Streptococcus mutans* (NCTC 10832).** *Int Endod J* 25, 142-149, 1992
172. Willoughby DA: **Vascular permeability and other factors in the modulation of the inflammatory response.** *J Endod* 3(6): 210 - 213, 1977
173. Yoshida N, Yoshida H, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa H: **Immunohistochemical localisation of HLA-DR-positive cells in unerupted and erupted normal and carious human teeth.** *J Dent Res* 75(8): 1585-1589, 1996
174. Zacharison BU: **Mast cells in human dental pulp.** *Arch Oral Biol* 16: 555-556, 1971