

## VIII. Streszczenie

Nieodwracalne zapalenie lub martwica miazgi wymaga jej usunięcia z kanału zęba, gdyż stanowi źródło zakażenia. Zażalenie czynnika szkodliwego w okresie apeksogenezy wymaga wdrożenia specjalistycznego leczenia endodontycznego – apeksyfikacji z wykorzystaniem wodorotlenku wapnia / MTA lub rewaskularyzacji. Różnica między tymi dwiema metodami polega na możliwości przywrócenia żywotności zęba, a także dalszego rozwoju korzenia oraz wzrostu grubości jego ścian w drugiej z wymienionych metod. Regeneracja kompleksu miazgowo -zębinowego metodą rewaskularyzacji umożliwia uniknąć negatywnych cech zębów martwych m.in. podatności na złamanie, a tym samym zwiększyć szanse na jego długotrwałe funkcjonowanie w jamie ustnej.

Zęby z niezakończonym rozwojem wierzchołka korzenia posiadają cechy odpowiednie dla powodzenia zabiegu rewaskularyzacji m.in. obecność komórek macierzystych, duże zdolności regeneracyjne pozostałych fragmentów miazgi, szeroki otwór wierzchołkowy umożliwiający migrację komórek i czynników wzrostu, obecność pochewki Hertwiga. Komórki macierzyste miazgi zęba (DPSCs) mają zdolność różnicowania się w odontoblasty, osteoblasty, chondrocyty, miocyty, adipocyty i neurocyty w zależności od działającego bodźca. Dotychczas metody regeneracyjne nie są powszechnie stosowane m.in. z powodu niedostatecznej wiedzy na temat protokołu leczenia oraz trudności w przygotowaniu potrzebnych preparatów.

Resorpcja jest jednym z możliwych powikłań występujących po urazach zębów stałych, która może doprowadzić do utraty zęba. Dlatego istotnym jest wczesne wykrycie resorpcji z uwagi na gwałtowny jej przebieg oraz postępujący charakter zmian pomimo wdrożonego leczenia. Celem leczenia jest zahamowanie procesu zapalnego i wypełnienie kanału m.in. materiałem MTA i ciekłą gutaperką.

Laseroterapia stosowana jest jako leczenie wspomagające powikłań stanów zapalnych miazgi, szczególnie po urazach zębów. Światło lasera posiada następujące właściwości: przeciwbólowe, przeciwzapalne, regeneracyjne, angiogenne, stymulujące proliferację i gojenie. Z uwagi na ww. cechy lasery

biostymulacyjne znalazły zastosowanie we wszystkich gałęziach stomatologii, w tym w metodach regeneracyjnych stomatologii wieku rozwojowego.

Podstawą rewaskularyzacji jest angiogeneza, która polega na tworzeniu nowych naczyń krwionośnych na podstawie już istniejących. Jest to proces wieloetapowy zależny od czynników proangiogennych m.in. VEGF, FGF, PDGF, ANG1, MMP. Poszukiwania dodatkowych substancji zwiększających szanse na odtworzenie sieci naczyń krwionośnych skutkowało wykryciem katelicydyny. Jest to naturalnie występujący w organizmie człowieka peptyd charakteryzuje się właściwościami przeciwwirusowymi, przeciwgrzybiczymi, przeciwbakteryjnymi, chemotaktycznymi oraz nasilającymi uwalnianie cytokin. Katelicydyna sprzyja migracji, proliferacji i adhezji komórek śródbłonka. Doprowadza do tworzenia struktur rurowatych będących prekursorami naczyń krwionośnych.

## **Materiał i metoda:**

### **W badaniach klinicznych przeprowadzono:**

1. Apeksyfikację z wykorzystaniem MTA w 21 zębach.
2. Rewaskularyzację w 7 zębach.
3. Leczenie resorpcji jako powikłania urazu w 4 zębach.
4. Laseroterapię jako leczenia wspomagające.

**Do badań doświadczalnych** wykorzystano komórki macierzyste miazgi (DPSC) dostarczone przez firmę Lonza. Z dostarczonych informacji wynika, że zostały one wyizolowane z trzecich zębów trzonowych. W dołączonym certyfikacie określono specyfikacje m.in. optymalną gęstość wysiania komórek na płytce (5 tys./cm<sup>2</sup>), zalecany czas przepasażowania komórek (5 - 7 dni), gwarancję niezmienności fenotypu komórek do 10 pasaży. Hodowla komórkowa była przeprowadzana zgodnie z wymienionymi zaleceniami i stymulowana katelicydyną w odpowiednich stężeniach – 1µg/ml, 10µg/ml, 15µg/ml, 20µg/ml oraz 30µg/ml. Katelicydyna została dostarczona w postaci krystalicznej z firmy Isca Biochemicals. Zgodnie z zaleceniami producenta rozpuszczano ją w wodzie depowanej. Ilościową analizę wydzielanych czynników proangiogennych dokonano testem ELISA. Test RT – PCR pozwolił na ocenę zmian w genomie komórek pod wpływem działania katelicydyny. Ocenę proliferacji komórek macierzystych miazgi oceniono testem BrDU. Wpływ katelicydyny na zmienność

fenotypu komórek macierzystych miazgi oceniono metodą immunocytochemiczną.

## Wyniki

### Badanie kliniczne

1. Apeksyfikacja z wykorzystaniem MTA – powodzenie w 21 przypadkach.
2. Rewaskularyzacja – powodzenie w 5 przypadkach. Powikłanie w pozostałych 2 przypadkach związane było z zaawansowaną resorpcją zapalną wynikającą z dużego zakresu urazu.
3. Protokół leczenia resorpcji gwarantuje zahamowanie postępującego procesu patologicznego – powodzenie w 4 przypadkach. Leczenie resorpcji tą metodą 2 przypadków zaliczanych do grupy rewaskularyzacji zakończone sukcesem.
4. Laseroterapia działa wspomagająco na gojenie zmian zapalnych w tkankach okołokorzeniowych.

### Badanie doświadczalne

1. Analiza ilościowa (test ELISA) – wzrost wydzielania czynników proangiogennych tj. FGF2, PDGFAA, ANG1 przez komórki macierzyste miazgi (DPSCs) po stymulacji katelicydyną.
2. Analiza wpływu na genom (test RT - PCR) – potwierdzono wpływ katelicydyny na poziomie genomu komórek macierzystych miazgi (DPSCs).
3. Analiza proliferacji (test BrDU) – nie stwierdza się wzrostu proliferacji komórek macierzystych miazgi (DPSCs) po stymulacji katelicydyną.
4. Analiza zmienności fenotypu (test ICC) – brak zmiany fenotypu komórek macierzystych miazgi (DPSCs) po stymulacji katelicydyną.

## Wnioski

1. Rewaskularyzacja jest nowatorską metodą leczenia umożliwiającą rewitalizację miazgi i dalszy rozwój korzenia. Pogrubienie jego ścian zwiększa odporność na złamanie. Apeksyfikacja z wykorzystaniem MTA jest metodą leczenia przypadków niezakwalifikowanych do

rewaskularyzacji. Nieudana próba rewaskularyzacji nie wyklucza wykonania apeksyfikacji.

2. Skutecznym materiałem do leczenia zaawansowanej resorpcji zapalnej jest MTA.
3. Katelicydyna zwiększa wydzielanie czynników proangiogennych przez komórki macierzyste miazgi, tym samym można ją wykorzystać jako czynnik stymulujący angiogenezę w procesie rewaskularyzacji.
4. Biostymulacja laserowa powinna być stosowana jako leczenie wspomagające apeksyfikację, rewaskularyzację i resorpcję zapalną, gdyż przyspiesza proces gojenia i zwiększa szanse na długotrwałe utrzymanie zęba w jamie ustnej.

## Summary

Irreversible inflammation or necrosis of pulp requires removing it from the root canal, as it constitutes source of infection. An impact of a harmful factor in the period of apexogenesis requires implementation of a specialist endodontics treatment – apexification using calcium hydroxide /MTA or revascularization. The difference between these two methods consists in the possibility to restore the tooth's vitality and further development of the root with an increase in the thickness of its walls in the case of the application of the latter of the above mentioned methods. Regeneration of the pulp-dentin complex with the revascularization method enables to avoid negative traits of dead teeth, i.a. vulnerability to breaking, and therefore increases the chances for long-term functioning of the tooth in the oral cavity.

Teeth with underdeveloped top of the root possess traits that make them suitable for a successful revascularization treatment, i.a. presence of stem cells, substantial regeneration potential of the remaining parts of the pulp, wide apical foramen enabling migration of cells and growth factors, presence of Hertwig epithelial root sheath. Stem cells of the tooth pulp (DPSCs) have the ability to differentiate into odontoblasts, osteoblasts, cartilage corpuscles, myocytes, adipocytes and perikarions, depending on the stimulant. Currently the regeneration methods are not commonly used, i.a. due to insufficient knowledge of treatment protocol and difficulties in preparing relevant preparations.

Resorption is one of possible complications after succedaneous teeth trauma, which can lead to tooth loss. That is why early diagnosis of resorption is crucial, as its course is rapid and changes proceed in spite of the performed treatment. The treatment aims at slowing down the inflammation process and filling the canal i.a. with MTA material and liquid gutta-percha.

Laser treatment is used as supportive therapy of complications after pulp inflammation, especially after teeth trauma. The laser light gives the following effects: anodyne, anti-inflammatory, regenerating, causing angiogenesis, proliferation and healing- stimulating. Due to the above mentioned traits, bio-stimulating lasers are used in all branches of dentistry, including regeneration methods used in paedodontics.

Angiogenesis is the basis of revascularization. It consists in creating new blood vessels basing on the already existing ones. It is a multi-stage process depending on pro-angiogenetic factors including VEGF, FGF, PDGF, ANG1, MMP. Search for additional substances increasing the chances for recreating the blood vessel network resulted in the discovery of cathelicidin. Cathelicidin is a peptide naturally occurring in the human body, which has antiviral, antifungal, antibacterial, and chemoattractive properties, as well as increasing the release of cytokines. Cathelicidin aids migration, proliferation and adhesion of endothelium cells. It also leads to creation of tubular structures, which are the precursors of blood vessels.

### **Materials and methods:**

**The following procedures were performed in clinical trials:**

1. Apexification using MTA in 21 teeth.
2. Revascularization in 7 teeth.
3. Treatment of resorption as trauma complication in 4 teeth.
4. Laser treatment as supporting treatment.

Pulp stem cells (DPSC) delivered by Lonza were used **for the experimental research**. The information provided by the producer advised that they were isolated from three molars. An attached certificate specifies i.a.: optimal cell inoculation density on the plate (5,000/ cm<sup>2</sup>), recommended time of cell passaging (5-7 days), and a guarantee of permanence of phenotype of the cells up to the 10<sup>th</sup> passaging. Cells culture was performed in accordance with the stipulated recommendations and stimulated with cathelicidin in appropriate concentrations - 1µg/ml, 10µg/ml, 15µg/ml, 20µg/ml and 30µg/ml. Cathelicidin was delivered in crystalline form by Isca Biochemical. In accordance with producer's recommendation it was dissolved in DEPC-treated water. Quantity analysis of discharged pro-angiogenetic factors was performed with the ELISA test. RT-PCR test allowed for the assessment of changes in the cell genome resulting from cathelicidin treatment. Assessment of proliferation of pulp stem cells was performed with BrDU test. The influence of cathelicidin on variability of

phenotype of pulp stem cells was assessed using the immunocytochemical method.

## **Results**

### **Clinical trials**

1. Apexification using MTA – success in 21 cases.
2. Revascularization – success in 5 cases. Complications in the 2 remaining cases were related to advanced inflammation resorption deriving from substantial trauma.
3. Resorption treatment protocol guarantees that the progressive pathological process is slowed down – success in 4 cases. Treatment of resorption with this method in 2 cases from revascularization group was successful.
4. Laser-treatment supports healing inflammation changes in periradicular tissues.

### **Experimental research**

1. Quantity analysis (ELISA test) – increase in discharge of pro-angiogenic factors, that is: FGF2, PDGFAA, ANG1, by pulp stem cells (DPSCs) after cathelicidin stimulation.
2. Analysis of the influence on genome (RT – PCR test) – confirmed the influence of cathelicidin at the level of genome of pulp stem cells (DPSCs).
3. Analysis of proliferation (BrDU test) – no increase of proliferation of pulp stem cells (DPSCs) after cathelicidin stimulation.
4. Analysis of variability of phenotype (ICC test) – no changes in phenotype of pulp stem cells (DPSCs) after cathelicidin stimulation.

## **Conclusions**

1. Revascularization is an innovative method of treatment enabling regeneration of pulp and further development of the root. Thickening of its walls makes it more resistant to breaks. Apexification using MTA is a method of treatment of cases not qualified for revascularization. A failed attempt at revascularization does not preclude apexification.
2. MTA is an effective material to treat advanced inflammation resorption.

3. Cathelicidin increases the discharge of pro-angiogenetic factors by pulp stem cells. Due to that they can be used as a stimulating factor for angiogenesis in the revascularization process.
4. Laser biostimulation should be performed as apexification-, revascularization- and inflammation-resorption-supporting treatment as it accelerates the process of healing and increases the chances for prolonged sustaining of the tooth in the oral cavity.