

УДК 616.314.163-08

А.П. Педорец, С.И. Максютенко, А.Г. Пиляев, И.А. Юровская, О.В. Шабанов

ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького», Донецк, ДНР

## ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПЕРИОДОНТИТА И ИХ СВЯЗЬ С СОДЕРЖАНИЕМ IL-1 $\beta$ В ПЕРИАПИКАЛЬНОМ ЭКССУДАТЕ

Периапикальное воспаление представляет собой локальный иммунный ответ на инфекцию пульпы и может рассматриваться как линия защиты, целью которой является локализация инфекции в пределах корневого канала и недопущение ее распространения в периапикальные ткани [1, 2]. Это показывает, что патологическое влияние инфекции обеспечивается путем вовлечения различных клеток (макрофагов, лимфоцитов, нейтрофилов), эффекторных молекул, гуморальных антител и межклеточных медиаторов воспалительного ответа. Интерлейкин-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) рассматривается как ключевой медиатор, регулирующий воспалительный процесс и стимулирующий костную резорбцию [3, 4]. Хотя интерлейкины IL-1 $\beta$  синтезируются преимущественно макрофагами периапикальной гранулемы, их активность на разных стадиях развития гранулемы существенно различается [5, 6], поскольку рост гранулемы не является постоянным процессом, а происходит дискретно в периоды клинического обострения воспалительного процесса.

Наиболее ранние периапикальные изменения в периодонте включают миграцию полиморфноядерных лейкоцитов и моноцитов. Прямое исследование роли цитокинов в периапикальном воспалении и резорбции кости было проведено Wang X.. Было показано, что высокий уровень интерлейкинов определяется во время обострения процессов, а низкий – в хронической фазе [7]. В то же время, как показали многочисленные исследования, клиническое течение апикального периодонтита не всегда отражает характер патоморфологических изменений в периодонте [8, 9].

Деструкция костной ткани не является перманентным процессом, а проявляется дискретно и связана с активацией тех или иных функций иммунокомпетентных клеток. В связи с этим понятно, что как гистологические проявления, так и иммунологические в клинических наблюдениях отражают только изменения, име-

ющиеся на данный момент, и зависят от промежутка времени от возникновения и течения периодонтита. Современные исследования показывают, что в активную продукцию интерлейкинов вовлекается только небольшое количество макрофагов, которое при хроническом течении периодонтита не превышает 2-3% от всех макрофагов, присутствующих в периапикальной гранулеме [10]. Становится понятным, что характер связи между содержанием интерлейкинов и клиническими проявлениями не может оцениваться только на материалах клинических исследований. В экспериментальных исследованиях возможно воспроизвести периодонтит с острой (быстрой) фазой воспаления и хронической (стационарной) фазой, с четко определяемыми временными промежутками от момента исследования.

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить характер связи между содержанием IL-1 $\beta$  в периапикальном экссудате и характером периапикального воспаления в зубах с экспериментально вызванным апикальным периодонтитом.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование, отраженное в этой работе, выполнено согласно правилам Европейской Конвенции о защите животных, которые используются в экспериментальных исследованиях, действующему законодательству и полностью отвечает всем этическим требованиям [11]. Для решения поставленной задачи были использованы 24 корня в 12 премолярах нижней челюсти у 6 беспородных собак возрастом 1,5–2 года с полностью сформированными верхушками корней. Обезболивание проводилось введением 5% раствора тионембутала

натрия (10 мг на кг веса). Полость зуба вскрывалась при помощи шаровидного карборундового бора. После удаления пульпы и раскрытия устьев корневые каналы были инструментально обработаны с последовательным применением Handstrom-файлов №15-25. В 12 каналах апикальное отверстие было искусственно сформировано для моделирования острой фазы воспаления при помощи К-файлов последовательно до 40 размера, до появления кровотечения из корневого канала. При помощи корневой иглы из пришеечной области зубов собак был собран налет и введен в каждый корневой канал. Зубы были оставлены открытыми на 90 дней. Через 90 дней оценивали рентгенологические изменения в периапикальной области.

**Получение периапикального экссудата.** Забор периапикального экссудата проводили через 90 дней после инфицирования содержимого корневых каналов. После инструментальной обработки корневого канала без применения антисептиков и высушивания корневого канала стерильными бумажными штифтами стерильный бумажный штифт 35 размера вводили в корневой канал на установленную рабочую длину и удерживали в течение 60 секунд. Если извлеченный из канала бумажный штифт был сухим, то для поступления экссудата из периапикальной области в корневой канал файлом 10 размера осторожно проникали через верхушечное отверстие. Бумажный штифт помещали в контейнер, содержащий 250 мкл фосфатно-солевого буферного раствора, перемешивали в течение 1 мин при 5000 об/мин и хранили в морозильной камере до времени анализа. Объем жидкости рассчитывали по стандартной кривой и выражали в мкл.

**Определение содержания интерлейкина** проводили с помощью иммуноферментного анализа. Количественное определение IL-1 $\beta$  проводили с использованием тест-систем «Интерлейкин-1 бета-ИФА-БЕСТ» производства АО «Вектор-БЕСТ» (Россия). При выполнении

анализа использовался принцип двусайтового иммуноферментного анализа. Интенсивность окраски продуктов реакции, которая прямо зависела от содержания определяемого вещества в исследуемом материале, измеряли на планшетном ридере «Multiscan EX» (Thermo Electron Corp., Финляндия) при длине волны 450 нм. Концентрацию рассчитывали по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания веществ в стандартных пробах. Концентрацию IL-1 $\beta$  определяли в пкг/мл.

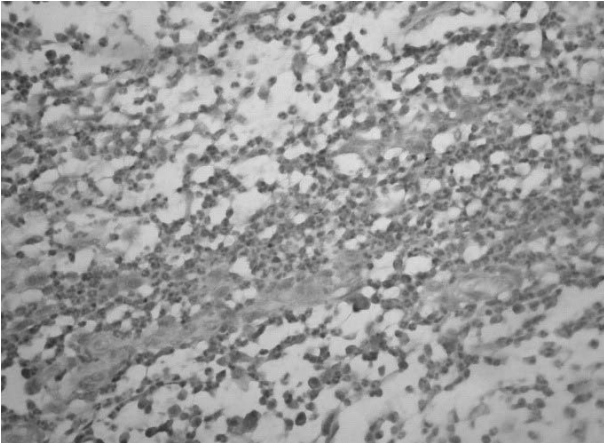
**Патоморфологическое исследование гранулем.** Зубы удаляли и фиксировали в 10-процентном нейтральном формалине. Затем мягкие ткани, связанные с корнем зуба, были тщательно отделены и залиты в парафин по стандартной методике [12, 13]. Декальцинация проводилась в муравьиной кислоте с применением электролиза в течение 6-8 часов. Образцы были помещены на 6 часов – в 70-процентный этиловый спирт, на 6 часов – в 80-процентный этиловый спирт и на 24 часа – в 96-процентный этиловый спирт. После этого они выдерживались в течение 2 часов в эфире, а затем заливались парафином на 3 суток. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм, полученные на микротоме «Microtome МПС-2», были окрашены гематоксилином и эозином. Гистологические препараты были изучены под светооптическим микроскопом «Olympus BX-40» с использованием объективов x10, x20, x40, x100. Микрофотографирование произведено цифровой фотокамерой «Olympus U-TV1X» с программным обеспечением «Olympus DP-Soft». Исследования проводились на кафедре патологической анатомии ДонНМУ.

Для **количественной оценки характера воспалительного инфильтрата** использовали индексную оценку J.M. Tanomagu [14]: 1 – одиночные полиморфноядерные клетки (инфильтрат представлен преимущественно лимфоцитами и макрофагами); 2 – в инфильтрате, представленном мононуклеарными клетками, множе-

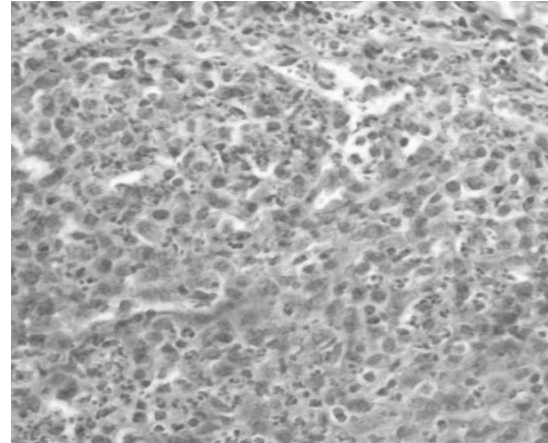
**Таблица 1.**

Распределение зубов с сохраненным и искусственно сформированным апикальным отверстием по степени выраженности воспалительной реакции

Апикальное отверстие	Всего, n	Степень воспалительной реакции			
		1	2	3	4
		количество зубов, n	количество зубов, n	количество зубов, n	количество зубов, n
Сохраненное	12	3	3	6	0
Искусственно сформированное	12	0	3	3	6
Всего, n	24	3	6	9	6



**Рис. 1.** Микрофотография очага скопления полиморфноядерных клеток в виде однородного инфильтрата. Окраска гематоксилином и эозином. ×400.



**Рис. 2.** Микрофотография абсцессов и полостей, окруженных полиморфноядерным экссудатом. Окраска гематоксилином и эозином. ×400.

ство полиморфноядерных клеток, которые не образуют скопления; 3 – инфильтрат представлен скоплениями полиморфноядерных клеток; 4 – наличие полостей и абсцессов, окруженных полиморфноядерными клетками.

**Статистика.** Статистический анализ полученных данных был проведен с использованием пакета прикладных программ Statistica. Средние величины определяли с использованием критерия Стьюдента. Связь между содержанием интерлейкина и характером воспаления проанализирована с использованием критерия Хи-квадрат. Все вычисления были выполнены с  $p < 0,05$ , который рассматривался как статистически значимый.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При патоморфологическом изучении периапикальных тканей, полученных от 12 корней зубов, апикальное отверстие которых было искусственно сформировано, во всех случаях отмечалось наличие признаков выраженного обострения апикального процесса, и клеточный инфильтрат был представлен макрофагами, лимфоцитами, плазматическими клетками, при этом полиморфноядерные клетки доминировали, образуя скопления нейтрофилов. На рисунке 1 представлена микрофотография очага со скоплением полиморфноядерных клеток в виде однородного инфильтрата.

Полиморфноядерные лейкоциты во всех случаях располагались диффузно, образуя скопления и формируя абсцессы рядом с апикальным отверстием. На рисунке 2 представлена микрофотография со сформированными абсцессами, окруженными полиморфноядерными клетками.

При экспериментальном воспроизведении периодонтита с разрушением апикального отверстия во всех случаях воспаление имело или тяжелую, или среднюю степень тяжести, согласно критериям J.M. Tanomaru [15].

Из 12 корней зубов с сохраненным апикальным отверстием в большинстве случаев в очаге воспаления доминировали мононуклеарные клетки с наличием одиночных и рассеянных полиморфноядерных лейкоцитов, при этом, несмотря на наличие в ряде случаев скоплений полиморфноядерных лейкоцитов, ни в одном случае формирование абсцессов не было отмечено.

Анализ гистологических проявлений в периапикальной ткани позволяет сделать вывод, что в зубах с искусственно сформированным апикальным отверстием периапикальная реакция во всех случаях сопровождалась доминированием полиморфноядерных клеток, что указывает на обострение воспалительного процесса. Эти данные подтверждают результаты, полученные Leonardo M.R., что перфорированная верхушка корня зуба связана с более активным течением воспаления в периапикальной области [16].

Распределение зубов в зависимости от выраженности воспалительной реакции в зубах с сохраненным и искусственно сформированным апикальным отверстием представлено в таблице 1.

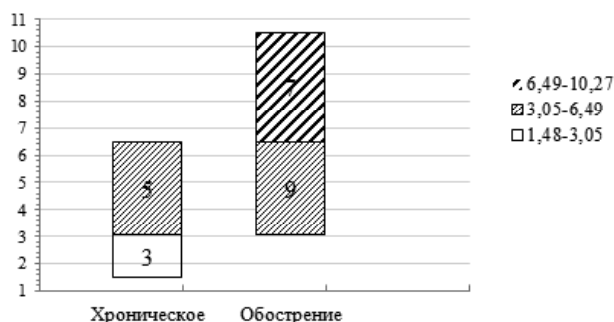
Как видно из таблицы 1, в зубах с сохраненным апикальным отверстием в 3 случаях препараты представлены мононуклеарными клетками с одиночными включениями полиморфноядерных клеток, в 3 случаях было обнаружено множество не образующих скопления полиморфноядерных клеток, и в 6 случаях инфильтрат был представлен скоплениями полиморфноядерных клеток, но ни в одном случае воспа-

ление не принимало абсцедирующего характера. Напротив, в зубах с искусственно разрушенным апикальным отверстием воспаление первой степени не было отмечено, а тяжелое воспаление наблюдалось в 6 случаях из 12.

В дальнейшем эти данные были сгруппированы в соответствии с выраженностью воспалительной реакции и проанализированы с помощью критерия Хи-квадрат (табл. 2.).

Из данных таблицы 2 видно, что воспалительная реакция разной степени выраженности была отмечена в зубах как с сохраненным, так и разрушенным апикальным отверстием. Данные анализа показывают отсутствие связи между степенью тяжести воспаления и состоянием апикального отверстия ( $p=0,4$ ). В то же время представляет интерес тот факт, что при искусственно сформированном апикальном отверстии в большинстве случаев гистологически определяется более выраженное обострение воспалительного процесса. В 75% случаев воспаление приобретало тяжелый характер. Несмотря на то, что разрушение апикального отверстия в большинстве случаев сопровождалось обострением воспалительного процесса, при сохраненном апикальном отверстии почти в половине случаев воспаление приобретало тяжелый характер. Поэтому мы выделили группы в зависимости от патоморфологических проявлений воспалительной реакции и изучили содержание ИЛ-1 $\beta$  в экссудате корневых каналов зубов. Данные представлены в таблице 3.

Из данных таблицы 3 видно, что при обостренном течении периодонтита содержание



**Рис. 3.** Диаграмма распределения показателей содержания интерлейкина в зубах с различными патоморфологическими проявлениями апикального периодонтита.

ИЛ-1 $\beta$  существенно выше ( $t=3,06$ ,  $p<0,05$ ), чем при хроническом течении.

В то же время, несмотря на статистически определяемые различия средних показателей, видно (рис. 3.), что уровень содержания ИЛ-1 $\beta$  не может отражать патоморфологический характер течения периодонтита, поскольку один и тот же уровень ИЛ-1 $\beta$  может определяться в зубах как с хроническим, так и обострившимся течением апикального периодонтита.

Становится понятным, что диффузное хроническое воспаление является активной формой периапикального поражения со значительной активностью гранулематозной ткани и на стадии развития характеризуется высокой секрецией провоспалительных интерлейкинов. Это может быть причиной того, что даже при хроническом течении отмечается, хоть и не в большом количестве, секреция интерлейкинов.

**Таблица 2.** Связь выраженности воспаления с состоянием апикального отверстия

Состояние апикального отверстия	Всего, n	Степень воспаления		P
		легкая	тяжелая	
Сохраненное	12	6	6	0,4
Искусственно сформированное	12	3	9	
Всего, n	24	9	15	-

**Таблица 3.** Средний уровень концентрации ИЛ-1 $\beta$  в экссудате корневых каналов при различных патоморфологических проявлениях апикального периодонтита

Патоморфологическое проявление	Количество наблюдений	Среднее значение, пг/мл	Ошибка среднего	Критерий достоверности (t)	Максимальное значение, пг/мл	Минимальное значение, пг/мл
Хроническое	8	3,71	0,68	3,06	6,49	1,48
Обострение	16	6,24	0,59	$P<0,05$	10,27	3,05

Проведенный анализ убедительно показывает, что определяется корреляция достоверная средней силы между характером течения и содержанием интерлейкина в обследуемых группах ( $r = 0,536$ ,  $t = 2,91$ ,  $p = 0,008$ ).

Согласно современной концепции патогенеза периодонтитов ограниченное скопление полиморфноядерных клеток прямо указывает на наличие сформированной микробной биопленки, которое характеризует неэффективность иммунных механизмов очищения. Полученные данные показывают, что IL-1 $\beta$  преимуществен-

но действует как медиатор острого системного ответа, который обеспечивает рекрутирование моноцитов, полиморфноядерных клеток, стимулирующих продукцию IL-1 $\beta$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наивысший уровень интерлейкина соответствует стадии обострения и стадии развития гранулемы. Полученные данные подтверждают, что различия в количестве IL-1 $\beta$  могут быть одним из индикаторов активности воспалительного процесса.

*А.П. Педорец, С.И. Максютенко, А.Г. Пиляев, И.А. Юровская, О.В. Шабанов*

*ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького», Донецк, ДНР*

### ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПЕРИОДОНТИТА И ИХ СВЯЗЬ С СОДЕРЖАНИЕМ ИЛ-1 $\beta$ В ПЕРИАПИКАЛЬНОМ ЭКССУДАТЕ

Целью исследования было изучить характер связи между содержанием ИЛ-1 $\beta$  в периапикальном экссудате и характером периапикального воспаления в зубах с экспериментально вызванным апикальным периодонтитом. Экспериментально апикальный периодонтит воспроизведен в 24 каналах 12 премоляров нижней челюсти. Гистологические препараты были изучены под светооптическим микроскопом «Olympus BX – 40». Определение содержания интерлейки-

на проводили с помощью иммуноферментного анализа. Было установлено, что наивысший уровень интерлейкина соответствует стадии обострения и роста гранулемы. Полученные данные подтверждают, что различия в количестве ИЛ-1 $\beta$  могут быть одним из индикаторов активности воспалительного процесса.

**Ключевые слова:** экспериментальная модель периодонтита, интерлейкин-1 $\beta$ , периапикальное воспаление.

*A.P. Pedorets, S.I. Maksiukenko, A.G. Piliaiev, I.A. Iurovskaia, O.V. Shabanov*

*SEI HPE «M. Gorky Donetsk National Medical University», Donetsk, DPR*

### PATHOMORPHOLOGICAL MANIFESTATIONS OF EXPERIMENTAL APICAL PERIODONTITIS AND THEIR RELATIONSHIP WITH THE CONTENT OF IL-1 $\beta$ IN PERIAPICAL EXUDATE

The aim of the study was to investigate the association between the morphological features in periodontitis with the pathomorphological manifestation of experimental apical periodontitis. For the experimental purposes apical periodontitis has been reproduced in 24 root canals in 12 premolars of the mandible. Histological slices were investigated under the light optical microscope Olympus BX- 40. IL-1 $\beta$  was measured by enzyme-linked immunosorbent essays.

It has been found out that the highest level of IL-1 $\beta$  corresponded to chronic lesion in the stages of acute exacerbation and granulomas in early developing stages. The study results suggest that the differences in quantity in IL-1 $\beta$  may be an indicator of activity of inflammation in apical periodontitis.

**Key words:** experimental model of periodontitis, interleukin-1 $\beta$ , periapical inflammation.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Karamifar K., Tondari A., Saghiri M.A. Endodontic Periapical Lesion: An Overview on the Etiology, Diagnosis and Current Treatment Modalities. *Eur Endod J.* 2020; 5 (2): 54-67.
2. Colic M. et al. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol. Immunol.* 2009; 47: 101-113. doi: 10.1016/j.molimm.2009.01.011.
3. Jakovljevic A., Knezevic A., Karalic D., Soldatovic I., Popovic B., Milasin J. et al. Pro-inflammatory cytokine lev-

## REFERENCES

1. Karamifar K., Tondari A., Saghiri M.A. Endodontic Periapical Lesion: An Overview on the Etiology, Diagnosis and Current Treatment Modalities. *Eur Endod J.* 2020; 5 (2): 54-67.
2. Colic M. et al. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol. Immunol.* 2009; 47: 101-113. doi: 10.1016/j.molimm.2009.01.011.
3. Jakovljevic A., Knezevic A., Karalic D., Soldatovic I., Popovic B., Milasin J. et al. Pro-inflammatory cytokine lev-

- els in human apical periodontitis: correlation with clinical and histological findings. *Aust Endod J.* 2015; 41 (2): 72-77.
4. Vier F.V.; Figueiredo J.A.P.; Lima A.A.S. Morphologic analysis of apical resorption on human teeth with periapical lesions. *Ecler Endodontics.* 2000; V. 2, 3: 2-5.
  5. Braz-Silva P.H. et al. Inflammatory profile of chronic apical periodontitis: A literature review. *Acta Odontol. Scand.* 2019; 77: 173-180. doi: 10.1080/00016357.2018.1521005.
  6. Wang C.Y., Stashenko P. Characterization of bone-resorbing activity in human periapical lesions. *Endod.* 1993; 19: 107-111.
  7. Wang X., Thibodeau B., Trope M. et al. Histologic Characterization of Regenerated Tissues in Canal Space after the Revitalization/Revascularization Procedure of Immature Dog Teeth with Apical Periodontitis. *J Endod.* 2010; 36: 5663.
  8. Юровская И.А., Педорец А.П., Пиляев А.Г. и др. Периапикальная резорбция цемента корня и ее связь с патогистологическими проявлениями хронического периодонтита. *Архів клінічної та експериментальної медицини.* 2011; Т. 20, 1: 78-84.
  9. Педорец А.П., Пиляев А.Г., Юровская И.А. и др. Патоморфологический анализ апикальных и периапикальных тканей зубов с хроническим периодонтитом. *Эндодонтист.* 2011; 1: 3-6.
  10. Ihan Hren N., Ihan A. T-lymphocyte activation and cytokine expression in periapical granulomas and radicular cysts. *Arch Oral Biol.* 2009; 54: 156-161.
  11. Белоус А.П., Педорец А.П., Исакова Н.А., Пиляев А.Г. Патоморфологические проявления экспериментального апикального периодонтита у собак. *Архів клінічної та експериментальної медицини.* 2012; 1: 62-67.
  12. Гасюк А.П., Шепітько В.І., Ждан В.М. Морфо- та гістогенез основних стоматологічних захворювань. *Полтава, 2008.* 94.
  13. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. С-Пб: СпецЛит, 2010. 95.
  14. Tanomaru J.M.G., Leonardo M.R., Silva L.A.B., Poliselino Neto A., Tanomaru-Filho M. Histopathological Evaluation of Different Methods of Experimental Induction of Periapical Periodontitis. *Braz. Dent. J.* 2008; 19 (3): 238-244.
  15. Tanomaru-Filho M., Poliselino Neto A., Leonardo M.R., Silva L.A.B., Tanomaru J.M.G., Ito I.Y. Methods of experimental induction of periapical inflammation. Microbiological and radiographic evaluation. *International Endodontic Journal.* 2005; 38: 477-482.
  16. Leonardo M.R., Rossi M.A., Bonifácio K.C. Scanning Electron Microscopy of the Apical Structure of Human Teeth. *Journal of Endodontics.* 2007; V. 31, 4: 321-325.
4. Vier F.V.; Figueiredo J.A.P.; Lima A.A.S. Morphologic analysis of apical resorption on human teeth with periapical lesions. *Ecler Endodontics.* 2000; V. 2, 3: 2-5.
  5. Braz-Silva P.H. et al. Inflammatory profile of chronic apical periodontitis: A literature review. *Acta Odontol. Scand.* 2019; 77: 173-180. doi: 10.1080/00016357.2018.1521005.
  6. Wang C.Y., Stashenko P. Characterization of bone-resorbing activity in human periapical lesions. *Endod.* 1993; 19: 107-111.
  7. Wang X., Thibodeau B., Trope M. et al. Histologic Characterization of Regenerated Tissues in Canal Space after the Revitalization/Revascularization Procedure of Immature Dog Teeth with Apical Periodontitis. *J Endod.* 2010; 36: 5663.
  8. Yurovskaya I.A., Pedorets A.P., Pilyaev A.G. i dr. Periapikal'naya rezorbtitsiya tsementa kornya i ee svyaz' s patogistologicheskimi proyavleniyami khronicheskogo periodontita. *Arkhiv klinichnoï ta eksperimental'noï meditsini.* 2011; T. 20, 1: 78-84 (in Russian).
  9. Pedorets A.P., Pilyaev A.G., Yurovskaya I.A. i dr. Patomorfologicheskii analiz apikal'nykh i periapikal'nykh tkanei zubov s khronicheskim periodontitom. *Endodontist.* 2011; 1: 3-6 (in Russian).
  10. Ihan Hren N., Ihan A. T-lymphocyte activation and cytokine expression in periapical granulomas and radicular cysts. *Arch Oral Biol.* 2009; 54: 156-161.
  11. Belous A.P., Pedorets A.P., Isakova N.A., Pilyaev A.G. Patomorfologicheskie proyavleniya eksperimental'nogo apikal'nogo periodontita u sobak. *Arkhiv klinichnoï ta eksperimental'noï meditsini.* 2012; 1: 62-67 (in Russian).
  12. Gasyuk A.P., Shepit'ko V.I., Zhdan V.M. Morfo- ta gistogenez osnovnikh stomatologichnikh zakhvoryuvan'. *Poltava, 2008.* 94 (in Ukrainian).
  13. Korzhevskii D.E., Gilyarov A.V. Osnovy gistologicheskoi tekhniki. S-Pb: SpetsLit, 2010. 95 (in Russian).
  14. Tanomaru J.M.G., Leonardo M.R., Silva L.A.B., Poliselino Neto A., Tanomaru-Filho M. Histopathological Evaluation of Different Methods of Experimental Induction of Periapical Periodontitis. *Braz. Dent. J.* 2008; 19 (3): 238-244.
  15. Tanomaru-Filho M., Poliselino Neto A., Leonardo M.R., Silva L.A.B., Tanomaru J.M.G., Ito I.Y. Methods of experimental induction of periapical inflammation. Microbiological and radiographic evaluation. *International Endodontic Journal.* 2005; 38: 477-482.
  16. Leonardo M.R., Rossi M.A., Bonifácio K.C. Scanning Electron Microscopy of the Apical Structure of Human Teeth. *Journal of Endodontics.* 2007; V. 31, 4: 321-325.