

Postupak histološke, histokemijske i imunohistokemijske raščlambe periapikalnih bolesti na nedekalcificiranoj kosti sa zubima

Maja Kovačević¹
Tomislav Tamarut¹
Sanja Zoričić²
Snježana Bešlić¹

¹Katedra za oralnu patologiju
Kolegij dentalne patologije
Studij stomatologije
Medicinskog fakulteta
Sveučilišta u Rijeci
²Zavod za anatomiju
Medicinskog fakulteta
Sveučilišta u Rijeci

Sažetak

Svrha je rada bila ispitati i primijeniti postupak histološke, histokemijske i imunohistokemijske raščlambe serijskih rezova nedekalcificiranih psećih zuba s okolnim koštanim tkivom čeljusti. Na premolarima pasa mješanaca induciran je pulpitis i apikalni parodontitis bakterijskom florom iz usne šupljine. Trepanirana pulpna komorica 50 je dana izložena djelovanju oralne mikroflore. Pošto je životinja žrtvovana, nedekalcificirana je kost s dekoroniranim eksperimentalnim zubima uložena u metilmetakrilat i rezana wolfram-karbidnim nožem na debljinu 5 - 7 μ m. Rezovi su za histološku raščlambu bojeni toluidinskim plavilom, te metodom bojenja kisele fosfataze i tartarat - rezistentne kisele fosfataze. Za detekciju CD 45+ limfocita uporabljeno je imunohistokemijsko bojenje. Debljina rezova 5 - 7 μ m omogućila je na histološkim i histokemijskim pripravcima citološku raščlambu promjena u pulpi i periapeksu svjetlosnim mikroskopom *in situ*. Imunohistokemijsko bojenje nije bilo zadovoljavajuće. Postupak ulaganja nedekalcificirane kosti i zuba u metilmetakrilat i njihovo rezanje wolfram-karbidnim nožem zadovoljavajuća je tehnika za histološke i neke histokemijske raščlambe za potrebe istraživanja u endodonciji. Nužno je poboljšati metodu imunohistokemijskoga bojenja.

Ključne riječi: *histologija, nedekalcificirana kost, metilmetakrilat, periapikalne bolesti, psi.*

Acta Stomat Croat
2003; 261-267

PREDHODNO PRIOPĆENJE
Primljeno: 15. veljače 2002.

Adresa za dopisivanje:

Maja Kovačević,
Mihanovićevo 13
51000 Rijeka
Tel.: 051 213 255
Fax: 051 216 083
E-mail: kmaja@medri.hr

Uvod

Raščlamba periapikalnih promjena na zubima u ljudi uglavnom je usmjerena na proučavanje pojava u mekim tkivima dobivenim kirurškim odstranjenjem tijekom resekcije vrška korijena zuba (1, 2). Periapikalne lezije liječene apikoektomijom uglav-

nom su meko tkivo u uznapređovalu stadiju upale, velike su i rezistentne na konzervativnu terapiju. U raščlambi tako dobivenih pripravaka manjkaju informacije o stanju koštanoga tkiva.

Rani stadij apikalnoga parodontitisa ili prijelazni stadij pulpitisa u apikalni parodontitis može biti analiziran samo *in situ*. Zato je nužan rad na ekspe-

rimentalnim životinjama. Najčešće rabljene životinje za istraživanja u endodonciji jesu štakori i miševi.

Za istraživanje patofiziologije apikalnih parodontitisa *in situ* prikladniji su veći sisavci jer se infekcija iz pulpe u periapikalna tkiva ne širi tako brzo kao u malih, npr. u štakora. U većih je sisavaca moguće analizirati prijelazni stadij pulpitisa u apikalni parodontitis (3, 4).

Histokemijske i imunohistokemijske raščlambe promjena u kosti izvođene su uglavnom na pripravcima štakora demineraliziranih s 10% EDTA (5, 6). Male čeljusti štakora s malim zubima mogu biti demineralizirane u nekoliko dana. Veće čeljusti s većim zubima, poput onih u pasa i uz uporabu kelatora 10% EDTA, ne mogu se demineralizirati u nekoliko dana. Stajanjem se bjelančevine razgrađuju i ne mogu biti identificirane. Uzorci čeljusti većih sisavaca mogu se demineralizirati jačim kiselinama poput nitrata, mravlje ili trikloroctene (7), ali one oštećuju bjelančevine (8), što uzorke čini neprikladnima za histokemijske i imunohistokemijske raščlambe (9).

Opisane su razne metode za pripremu nedemineralizirane kosti sa zubima. Gross & Strunz (10) opisuju postupak dobivanja uzoraka nedemineralizirane kosti rezovima debljine 50 - 200 μm . Međutim, dublje strukture takvih rezova ostaju nebojene. Donath & Breuner (11) opisuju "tehniku piljenja i brušenja" koja osigurava tanje rezove. Ovaj potonji postupak zahtijeva posebnu opremu. Posljedica brušenja jest gubitak većega dijela uzorka.

Svrha je ovoga istraživanja ispitati mogućnost izradbe histoloških, histokemijskih i imunohistokemijskih pripravaka na nedekalcificiranom uzorku psecih zuba s okolnom alveolarnom kosti debljine 5 - 7 μm .

Materijali i postupci

Protokol eksperimenta odobrila je Hrvatska veterinarska komora (odobrenje br. 111/97). Eksperiment je proveden na dvama psima mješancima. U svakoga su psa obrađena dva dvokorijenska mandibularna premolara, ukupno osam zubnih korijena. Psi su bili muškoga spola, teški između 10 i 15 kilograma, i u dobi od 4 i 5 godina. Prema tjelesnoj težini svakoga psa određena je količina anestetika.

Za anesteziranje pasa mješanaca upotrijebljen je ketamine hydrochloride, (Ketanest[®] 35 mg / kg t. t. ; Goedeche / Parhe - Davis, Berlin, Germany) i xylazine (Rompun[®], 10 mg / kg t. t. ; Bayer AG, Leverkusen, Germany). Pulpne komore mandibularnih premolara otvorene su niskookretajnom bušilicom. Pulpitis i apikalni parodontitis inducirani su izlaganjem pulpe oralnoj mikroflori 50 dana. Po isteku eksperimentalnoga vremena životinje su žrtvovane. Mandibule su uklopljene i mehanički rezane u male blokove tako da svaki blok sadrži najviše tri premolara. Budući da je u pripremi nedekalcificiranoga zuba za rezanje najveća teškoća rezati caklinu, zbog tvrdoće, ispitivani zubi su *in situ* dekoronirani dijamantnim svrdlima niskookretajnom bušilicom uz vodeno hlađenje.

Pripremljeni blokovi tkiva isprani su fiziološkom otopinom i zatim fiksirani uranjanjem u 4% paraformaldehid, pH 7,4 na 4°C 24 sata. Nakon završetka fiksacije tkivo je spremljeno u 70% etanol u kojemu može ostati do nastavka postupka, a najmanje 48 sati.

Nakon 48 sati tkivo je bilo spremno za uklapanje u plastični medij (metil-metakrilat) primjenom tehnike uranjanja u otopinu prema sljedećem protokolu:

Prvo je izvršena dehidracija tkiva u seriji etanola rastućih koncentracija (70%, 80%, 96% i 100% etanol - svaki tijekom 48 sati). Nakon dehidracije tkivo je uronjeno u ksilol tijekom 72 sata (s tri promjene svježega ksilola). Iza toga tkivo je postupno prožeto miješanom otopinom metilmetakrilata (Merck, Germany), dibutilftalata (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) i benzoilperoksida (Merck, Germany). Te su kemikalije miješane u tri različita omjera tako da se dobiju tri otopine u kojima se prožima tkivo kako slijedi u opisu:

1. otopina: 80 ml metilmetakrilata i 20 ml dibutilftalata tijekom 24 sata na +4°C;
2. otopina: 80 ml metilmetakrilata, 20 ml dibutilftalata i 1 g benzoilperoksida tijekom 24 sata na 4°C;
3. otopina: 80 ml metilmetakrilata, 20 ml dibutilftalata i 3 g benzoilperoksida tijekom 24 sata na 4°C.

Dok se tkivo prožima navedenim otopinama treba paziti da posude u kojima se radi budu hermetički zatvorene i da se temperatura ne digne iznad +4°C.

Potom se tkivo uklapa u zadnju otopinu za polimerizaciju koja je po sastavu istovjetna otopini pod brojem tri, ali se ne čuva na $+4^{\circ}\text{C}$ već u termostatu na 37°C . Obično se uklapanje provodi u staklenim bočicama koje se mogu hermetički zatvoriti, jer prigodom polimerizacije metakrilmetakrilata čep može iskočiti te počne hlapiti tekućina za polimerizaciju čime se smanjuje koncentracija sastojaka u njoj. Pošto završi polimerizacija (dva do tri dana), mehanički se razbije staklena bočica i dobije se prozirni tvrdi blok s uklopljenim tkivom koji je odmah spreman za rezanje. Za rezanje blokova uporabljen je rotacijski mikrotom Leica RM 2155 (Wiena, Austria) opremljen wolfram karbidnim nožem za rezanje tvrdih i mineraliziranih tkiva (Slika 1).



Slika 1. Rotacijski mikrotom za kost Leica RM 2155 (A) s wolfram-karbidnim nožem (B) za rezanje tvrdih i mineraliziranih tkiva. Plastični blok (C) s eksperimentalnim zubima montiran je na uređaj i orijentiran tako da se presjek mandibularnoga kanala (D) nalazi gore.

Figure 1. Rotating microtome for bone Leica RM 2155 (A), equipped with a tungsten carbide knife (B) for cutting hard and mineralised tissue. Plastic block (C) with experimental teeth mounted on the apparatus, and oriented in such a manner that the section of the mandibular canal is situated above (D).

Pripremljeni su serijski rezovi $5 - 7 \mu\text{m}$ i postavljeni na silanizirana stakla (Silane - Prep slides, Sigma Diagnostics, St.Louis, USA.). Tkivni su rezovi prekriveni mokrom celofanskom folijom, izravnati i sušeni pod pritiskom u termostatu na $+37^{\circ}\text{C}$ do histološke obradbe bojenja za mikroskopiju.

Prije bojenja rezovi su deplastificirani dva puta po 5 minuta u 100%-tnom acetonu, rehidrirani i tada su bili spremni za histološka, histokemijska i imuno-

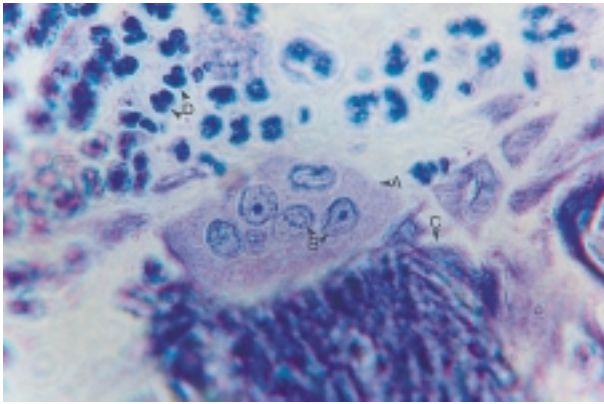
histokemijska bojenja. U toj fazi izradbe priprava opazili smo da se je tijekom bojenja jedan broj preparata odljepljivao od predmetnoga stakla. Uzroci te pojave ostali su nam nepoznati.

Toluidinplavo bojenje korišteno je za histološku raščlambu. Histokemijski je detektirana kiselina fosfataza i tartarat rezistentna kiselina fosfataza, a imunohistokemijski CD 45+ B-limfociti. Za detekciju kisele i tartarat rezistentne kisele fosfataze upotrijebljen je protokol proizvođača (Sigma Chemical Co., St.Louis, USA). Za imunohistokemijsku identifikaciju CD 45+ B - limfocita uporabljena su mišja anti - pseća monoklonalna antitijela (donacija: Prof. dr. P. F. Moore, Davis, California, USA). Zatim je aplicirano univerzalno sekundarno antitijelo - biotin (Serotec Ltd., Oxford, UK). Nakon bojenja sekundarnom avidin - biotin - imunoperoksidazom rezovi su inkubirani u kromogenu AEC i kontrastno obojeni hematoksilinom.

Rezultati

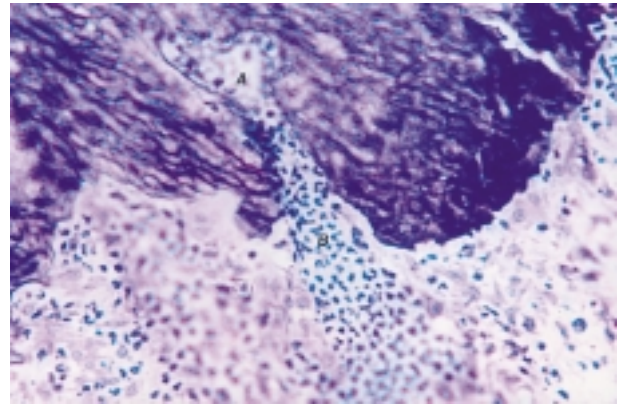
Tehnika uklapanja nedekalcificirane kosti sa zubima u metilmetakrilat i rezanje wolfram karbidnim nožem u rezove debljine $5 - 7 \mu\text{m}$ može se upotrijebiti za istraživanja u endodonciji. Teškoća rezanja tvrde cakline riješena je postupkom dekoroniranja zuba. Na taj način dobiveni uzorci debljine su $5 - 7 \mu\text{m}$ i prikladni su za potanku citološku raščlambu (Slika 2) upalnoga sadržaja mekoga tkiva i tvrdoga zubnog i okolnoga koštanog tkiva (Slika 3 i 3 a).

Opisanim postupkom može se izraditi više rezova. Time je omogućeno da se na istome zubu može primijeniti nekoliko tipova bojenja, što je teško postići metodom izbruska. Pored osnovnoga histološkog bojenja toluidinplavo, koje dobro i pregledno prikazuje anatomske strukture kao što su pulpno tkivo u korijenskom kanalu, dentin, cement, kost, vezivo periodontnoga ligamenta s krvnim žilama, živcima i druge anatomske strukture, može se razlikovati cijeli spektar različitih upalnih stanica, pratiti količina eksudata i nekroze u području pulnoga tkiva i periapeksne lezije (Slika 2; i 3 a). Osim osnovnoga histološkog bojenja (toluidinplavo) također je bilo moguće izvesti histokemijske (Slika 4) i imunohistokemijske raščlambe (Slika 5), što na kostima dekalificiranim s jačim kiselinama (nitratna, mravlja,



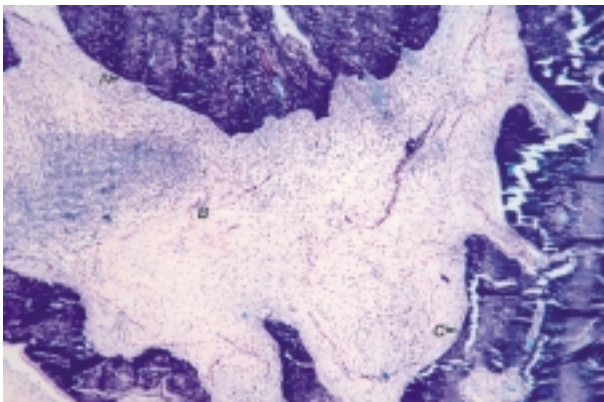
Slika 2. Osteoklast (A) s mnogobrojnim jezgrama na površini koštane alveole (B). Na slici se opažaju i stanice upalnog infiltrata (D - polimorfonukleari). Bojenje: toluidin plavo; x100.

Figure 2. Osteoclast (A) with multiple nuclei (B) on the surface of bone alveola (C). In the figure inflamed infiltrate cells can be seen (D - polymorphonuclear leucocytes). (Staining: toluidin blue: x100).



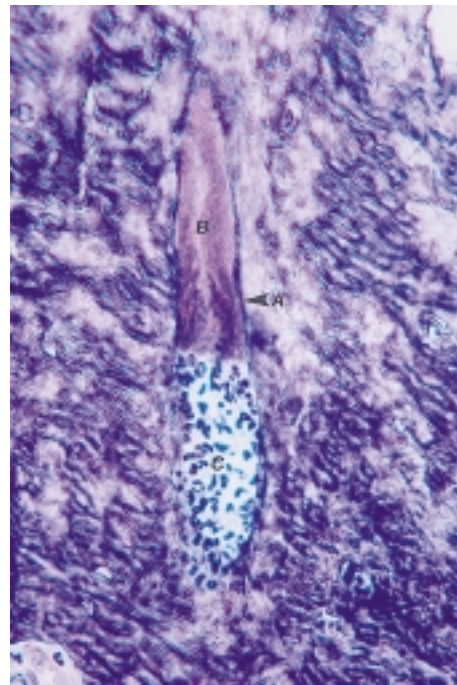
Slika 3 b. Otvor apeksne delte na površini apeksnoga vrška korijena (A). Na otvorima delte nalaze se nakupine polimorfonukleara (B). Bojenje: toluidin plavo; x20.

Figure 3b. The orifice of apical delta with surface of the apex of the root (A). Accumulation of polymorphonuclear leucocytes at the delta orifices (B). (Staining: toluidin blue: x20).



Slika 3 a. Periapikalna lezija zuba s akutnim apikalnim parodontitisom (A - površina korijena, B - područje periapikalne lezije s upalnim infiltratom, C - površina koštane alveole s brojnim resorpcijskim lakunama). Bojenje: toluidin plavo; x4.

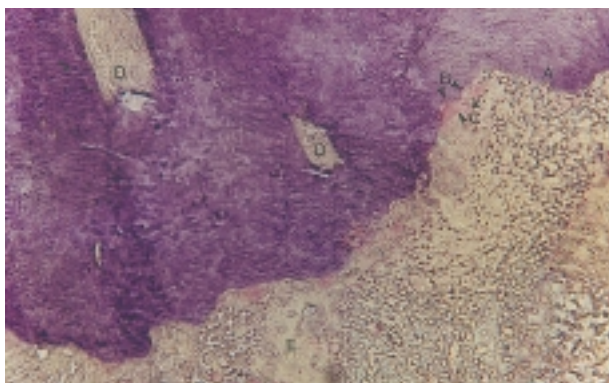
Figure 3a. Periapical lesion of the tooth with acute apical periodontitis (A - surface of the root, B - the area of the periapical lesion with inflamed infiltrate, C - the surface of bone alveola with multiple resorptive lacunae). (Staining: toluidin blue: x4).



Slika 3 c. Otvor apeksne delte na površini vrška korijena psecęga zuba (A). U cerviksnoj polovici otvora vidi se tanki sloj dentinske stijenke (B), a u apeksnoj polovici nakupine polimorfonuklearnih leukocita (C). Bojenje: toluidin plavo; x40.

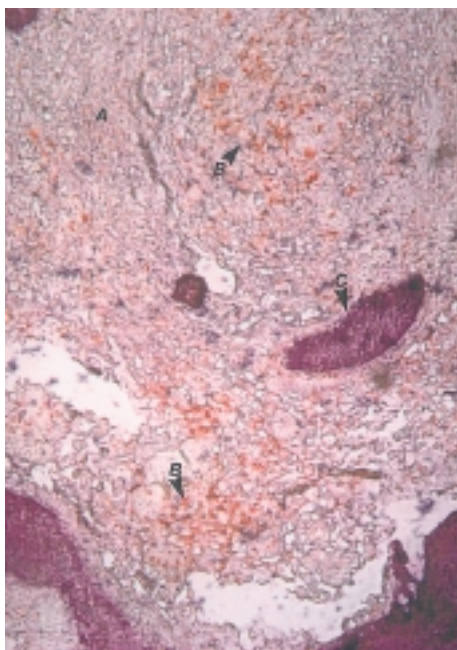
Figure 3c. The orifice of the apical delta (A). In the cervical half of the lumen a thin section of dentinal tissue can be seen (B), and in the apical half accumulation of polymorphonuclear leucocytes (C). (Staining: toluidin blue: x40).

triklor-octena) nije moguće. Histokemijskim ispitivanjem s pomoću detekcije aktivnosti kisele fosfataze prikazuju se osteoklasti i druge stanice koje stvaraju fagocitozu poput makrofaga, ali i sve stanice koje provode sekreciju ili apsorpciju. Enzim tartararrezistentna kiselna fosfataza specifična je za stanice koje pripadaju lozi osteoklasta. Te stanice ekstra-



Slika 4. Na površini korijenskoga cementa (A) u resorpcijskim lakunama (B) opaža se obojenje pozitivne aktivnosti tartarat rezistentne kisele fosfataze (C) u aktiviranim osteoklastima. Na slici je prikazano i područje otvora apeksne delte (D) te periapiksna lezija (E). Bojenje za tartarat kiselu fosfatazu; x20.

Figure 4. On the surface of the root cement (A) in resorptive lacunas (B) pink staining of the positive tartrate resistant acid phosphatase in activated osteoclasts can be seen (C). There are areas of apical delta orifices (D) and periapical lesion (E) in the figure. (TRAP staining; x20).



Slika 5. Slika prikazuje periapiksnu leziju (A) uz površinu alveolarne kosti s pozitivnim smeđe obojenim područjima lokalizacije CD 45 + B - limfocitima (B). U leziji su opažaju otočići koštanih gredica (C) Bojenje Avidin-biotin-immunoperoxidasa; x20.

Figure 5. The figure presents a periapical lesion beside alveolar bone (A) with brownish stained areas of localisation of CD 45 + B - lymphocytes (B). Islands of bony ridges can be seen inside the lesion (C). (Avidin-biotin-immunoperoxidase; x 20).

celularno luče opisane kiseline koje se u raščlambi boje ružičasto, što je znak osteoklastične aktivnosti kako to prikazuje slika 4. Imunohistokemijskim ispitivanjem dokazivali smo postojanje B-limfocita u kroničnim fazama periapikalne lezije, s pomoću markera CD45 koji je na površini njihove stanične membrane i u pripravcima se boji smeđom bojom (Slika 5).

Gubitak pripravka zbog odljepljivanja, tijekom opisanih bojenja, iznosio je približno 10 %.

Rasprava

Gross & Strunz (10) opisuju postupak rezanja nedemineraliziranih tvrdih tkiva u rezove debljine 50 -200 μm . Kod te metode dublje strukture ostaju neobojene, a i moguće je pripremiti samo jedan uzorak istoga zuba koji prikazuje i apikalni foramen i periapikalnu leziju.

Tvrdoća cakline stvara poseban problem pri uporabi nedekalcificiranih uzoraka. Donath & Brenner (11) opisali su "tehniku piljenja i brušenja" koja omogućuje dobiti veoma tanke rezove demineraliziranih zubnih tkiva, uključujući caklinu. Ipak, piljenjem i brušenjem uklanjaju se veliki dijelovi uzorka. Na koncu, iskoristiv je samo jedan do dva uzorka koji mogu prikazati apikalni foramen. Osim toga, tom se metodom gubi velika količina neiskorištenoga tkiva.

Za razliku od opisanih dvaju postupaka na nedemineraliziranom tkivu, ovim opisanim postupkom moguće je izraditi veći broj pripravaka jednoga zuba s okolnim tkivom, obojiti ih s više postupaka, a to stvara analitičke mogućnosti i može produbiti patofiziološke spoznaje o nastanku, oblikovanju i brzini širenja lezije.

Koncepcija ulaganja nedemineralizirane kosti u metilmetakrilat usavršena je (12, 13, 14) s pomoću wolfram karbidnoga noža koji omogućuje serijske rezove debljine 5 - 7 μm . Dekoroniranjem zuba, koje je uporabljeno u ovome radu, uklanja se teškoća rezanja cakline navedenim nožem.

Eksperimentalni modeli na životinjama kojima je bila svrha izučavati rane stadije periapikalnih promjena bili su iz praktičnih razloga provedeni, na štakorima (5, 6, 15). No, zub štakora nije pogodan

za takva istraživanja zbog svoje male veličine, morfologije i bioloških značajki, kao što je na primjer stalni rast zuba. Upitno je kako na takvu modelu izvesti usporedbu s patofiziološkim procesima koji se događaju pri pojavi apikalnoga parodontitisa u ljudi u kojih je to svojstvo drugačije. Zbog toga su razloga to statistički različite populacije neprimjerene osobinama humanih tkiva. Primjerice žvačno opterećenje zuba usporava razvoj apikalnoga parodontitisa u štakora (16), a u ljudi ubrzava proces (17), to jest pogoršava stanje. Zub štakora je također zbog svoje malenosti neprikladan za izučavanje tehnika čišćenja i oblikovanja korijenskoga kanala, i za njihovu procjenu, dok je na psećim zubima postupak prikladniji za usporedbu rada na humanim zubima.

Osim toga zbog svojih bioloških značajki veći sisavci, kao što su psi, mačke, majmuni i sl., prikladniji su za izučavanje patofiziologije apikalnoga parodontitisa *in situ* zato što njihovi zubi zadržavaju makroskopski stalan oblik i odnos korijena i apikalnoga parodonta nakon formiranja korijenskoga vrška (4), a širenje upale iz pulpe u periapiksna tkiva nije brzo kao u štakora (3).

Histokemijska i imunohistokemijska raščlamba kosti štakora uglavnom se izvodi na kosti dekalificiranoj s 10% otopinom EDTA (5, 6, 15). Ta blaga organska kiselina može uspješno dekalificirati veoma male kosti ili veoma male dijelove većih kostiju (10 x 6 x 2 mm) (18). Loša strana toga postupka jest pregrijavanje kosti pri rezanju velikih kosti na manje dijelove koji mogu biti prikladni za dekalificaciju s EDTA - om. Dekalifikacija s jačim kiselinama poput nitrata, mravlje ili triklor - octene uzrokuje denaturaciju bjelančevina, pa zato nije prikladna za histokemijsku i imunohistokemijsku raščlambu većih kostiju sa zubima (9).

Ovim opisanim postupkom je, osim histološke raščlambe, omogućena histokemijska i imunohistokemijska raščlamba pulpe i periapikalnoga tkiva *in situ* zato što se ovim postupkom znatnije ne oštećuju bjelančevine. Tako pripremljeni uzorci mogu se analizirati s pomoću standardnoga svjetlosnog mikroskopa.

Pripravke pripremljene opisanom metodom histološki smo analizirali s pomoću toluidin plavo bojenja. Histokemijsko bojenje kisele fosfataze dalo je zadovoljavajuće rezultate. Ljubičasto obojenje kisele

i tartarat - rezistentne kisele fosfataze bilo je vidljivo u osteoklastima uz površinu kosti i u cementoklastima koje smo opazili u resorptivnim lakunama cementa. Provedeno imunohistokemijsko bojenje CD 45+ B-limfocita dalo je samo okvirne rezultate. Nismo mogli uočiti specifične antigene na površini stanica, već smo samo identificirali okvirno područje nakupljanja CD 45+ B-limfocita. Postupak imunohistokemijskoga bojenja valja usavršiti.

Kako bi dobili najbolju fiksaciju rezove smo postavljali na silanizirana stakla i lijepili ih cijanoakrilatom. No nismo potpuno riješili problem adhezije uzoraka na silanizirana predmetna stakla. Time tumačimo pojavu odljepljivanja pripravka opisanu u rezultatima rada. Tijekom procesa bojenja, pri ispiranju, uzorci su se povremeno odljepljivali. Odljepljene uzorke nije bilo moguće vratiti na stalca pritiskom, a i zbog trganja pripravka bili su neuporabljivi. Iako je moguće obojiti uzorke bez deplastificiranja, kako tvrde Donath & Brenner (11), kakovća takva bojenja znatno je lošija. Pretpostavljamo da je slaba adhezija pripravka zuba i okolnoga tkiva posljedica njihove veličine i težine, te se nastojanja moraju usmjeriti kako bi se poboljšala adhezija pripravka na predmetna stakla.

Zaključci

Metoda uklapanja nedekalcificiranih zuba s okolnom čeljusnom kosti u metilmetakrilat pogodna je za histološke i histokemijske raščlambe. Imunohistokemijska raščlamba zahtijeva daljnje usavršavanje postupka.

Prednost je toga postupka u mogućnosti raščlambe pulpnoga tkiva, dentina, cementa i mekoga periapikalnog upalnoga tkiva. Osim toga, na taj način izrađeni preparati omogućuju procjene dinamike razvoja periapikalne lezije i procese oblikovanja i preoblikovanja koštanoga tkiva, što omogućuje da se produbljuju patofiziološke spoznaje.

Nepodobnost je postupka imunohistokemijska raščlamba u identifikaciji stanične populacije.

Nedostatnost je postupka u osjetljivosti lijepljenja pripravka na predmetno staklo.

Zahvala

Autori zahvaljuju prof. dr. Peteru F. Mooreu (Professor of Pathology, Department of Pathology, Microbiology and Immunology, University of California, USA) za donaciju antitijela za imunohistokemijsku raščlambu. Zahvaljujemo i Snježani Štimac i Mariji Mršić sa Zavoda za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci za pomoć u laboratorijskom dijelu eksperimenta. Hvala i Joyce Ččin - Šain i Nedi Banić za pomoć oko prijevoda teksta na engleski jezik.

Literatura

- SHIMAUCHI H, TAKAYAMA S, IMAI-TANAKA T, OKADA H Balance of interleukin-1 (and interleukin-1 receptor antagonist in human periapical lesions. *J Endodon* 1998; 24: 116-9.
- TAKAHASHI K, LAPIN DF, MACDONALD GD, KINANE DF. Relative distribution of plasma cells expressing immunoglobulin G subclass mRNA in human dental periapical lesions using *in situ* hybridisation. *J Endodon* 1998; 24: 164-7.
- JANSSON L, EHNEVID H, LINDSKOG S, BLÖMLOF L. Development of Periapical Lesions. *Swed Dent J* 1993; 17: 85-93.
- CROSSLEY DA, PENMAN S. Manual of small animal dentistry, 2 nd edn. Gloucestershire, UK: British small animal veterinary association, 1995.
- ANAN H, AKAMINE A, HARA Y, MAEDA K, HASHIGUCHI I, AONO M. A histochemical study of bone remodeling during experimental apical periodontitis in rats. *J Endodon* 1991; 17: 332-7.
- ANAN H, AKAMINE A, MAEDA K. An enzyme histochemical study of the behavior of rat bone cells during experimental apical periodontitis. *J Endodon* 1993; 19: 83-6.
- ŠVOB M. Histološke i histokemijske metode, 1st edn. Sarajevo, YU: Svjetlost, 1974.
- KARLSON P. Biokemija, 6. ed. Zagreb, Hrvatska: Školska knjiga, 1998.
- BECKSTEAD JH, HALVERSON PS, RIES CA, BAINTON DF Enzyme histochemistry and immunohistochemistry on biopsy specimens of pathologic human bone marrow. *Blood* 1981; 57: 1088-98.
- GROSS UM, STRUNZ U. Surface staining of sawed sections of undecalcified bone containing alloplastic implants. *Stain Techn* 1977; 52: 217-9.
- DONATH K, BREUNER G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. *J Oral Path* 1982; 11: 318-26.
- KABASAWA M, EJIRI K, OZAWA H. Histological observations of dental tissues using the confocal laser scanning microscope. *Biotechn Histochem* 1995; 70: 66-9.
- SANDERSON C. Polymerisation of mineralised bone specimens embedded in methylmethacrylate using ultraviolet irradiation. *J Histotech* 1995; 18: 323-5.
- ERBEN RG. Embedding of bone samples in methylmethacrylate - an improved method suitable for bone histomorphometry, histochemistry, and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1997; 45: 307-13.
- OKIJI T, KAWASHIMA N, KOSAKA T, KOBAYASHI C, SUDA H. Distribution of Ia antigen-expressing nonlymphoid cells in various stages of induced periapical lesions in rat molars. *J Endodon* 1994; 20: 27-31.
- KUMAZAWA M, KOHSAKA T, YAMASAKI M, NAKAMURA H, KAMEYAMA Y. Effect of traumatic occlusion on periapical lesions in rats. *J Endodon* 1995; 21: 372-5.
- ROSENBERG PA, BABICK PJ, SCHERTZER L, LEUNG A. The effect of occlusal reduction on pain after endodontic instrumentation. *J Endodon* 1998; 24: 492-6.
- BARKA T. Cellular localisation of acid phosphatase activity. *J Histochem Cytochem* 1962; 109: 232-3.