

Zavod za dentalnu patologiju  
 Stomatološkog fakulteta, Zagreb  
 predstojnik Zavoda prof. dr. sci. dr. Z. Njemirovskij

## **Određivanje rastvaranja kalcija u dentinskom tkivu\***

Z. JUGOVIĆ-GUJIĆ

### UVOD

Sekundarno dentinsko tkivo, kao i ostala tkiva u čovječjem organizmu, primjenom elektronske mikroskopije i drugih suvremenih dostignuća, i nadalje zanima sve veći broj istraživača.

Dentinsko tkivo nije statično tkivo, ono je svakodnevno izloženo raznim insultima (karijes, abrazija atricija, erozija itd), na koje mora biti sposobno odgovoriti, stvarajući zaštitni sloj — sekundarni dentin (Symons<sup>1</sup>, Langeland<sup>2</sup> Bernick<sup>3</sup>, Tronstad<sup>4</sup>, Sauerwein<sup>5</sup>).

Sekundarno dentinsko tkivo je općenito jače mineralizirano, ima smanjen broj dentinskih tubulusa, koji su nepravilno usmjereni i često bez protoplazmatskog nastavka. Prodiranje mikroorganizama i njihovih toksina je znatno smanjeno, što je veoma važno za zubnu pulpu. S druge strane, niti lijekovi neće imati onaj efekt, koji se očekuje od njihove aplikacije.

Konstantno deponiranje sekundarnog dentina, cijelog života, rezultira polaganim ali stalnim reduciranjem pulpne komore (Njemirovskij<sup>6</sup>, Scott<sup>7</sup>, Seltzer<sup>8</sup>, Jenkins<sup>9</sup>).

Osim navedenih insulta, koji djeluju na pulpu, postoje i drugi faktori, koji će uvjetovati stvaranje veće količine sekundarnog dentina, osobito donjih mezijalnih sjekutića — to su funkcijske stimulacije (Philippas<sup>10</sup>), kao i mastikatorne sile (McGhee<sup>11</sup>, Philippas<sup>12</sup>, Philippas i Appelbaum<sup>13</sup>). Seltzer<sup>8</sup> tvrdi, da, ako su odontoplasti jače stimulirani, kao npr. prilikom brušenja zubi ili akutnog karijesa, često se dogodi da oni propadnu, jer nisu bili spremni odgovoriti takvim drastičnim promjenama i na taj način nastaju prazni dentinski tubulusi.

Postoji još jedan način zaštite pulpe od akutnih i kroničnih insulta u životu, a to je ulaganje kristalnog apatita unutar dentinskog tubula, čime dentinsko tkivo propusno za toksine i bakterije (Handelman<sup>14</sup>, McKay<sup>15</sup>) i ostale tekućine, postaje nepropusno, tj. pretvara se u tzv. sklerotično dentinsko tkivo (Brännström<sup>15</sup>).

\* Eksperimentalni dio rada je obavljen u IRB, OOUR-»IME« u Zagrebu.

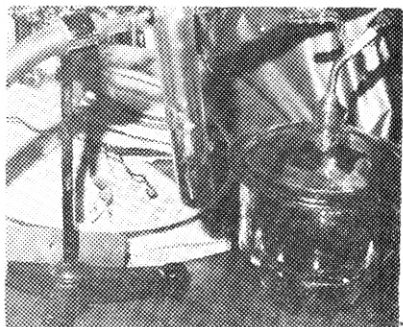
Osim ulaganja minerala u dentinske tubule, može doći do mineralizacije njihovih zidova, što će ovisiti o stupnju raznih iritacija zubi. Prema tomu, tu ne dolazi samo do ulaganja minerala unutar dentinskih kanalića, nego i do mineralizacije njihovih zidova, ukoliko je stimulans bio prejak. Tako promijenjeni dentinski tubuli imaju izjednačen indeks loma s okolnim nepromijenjenim dentinom pa se taj dio dentina naziva transparentnim ili sklerotičnim dentinom. Ovaj se dentin ne stvara kao odgovor na različite insulte zuba, nego je to redovita pojava, praćena starenjem organizma. Lokalizacija transparentnog dentina, najfrekventnija je na onim mjestima, gdje je reducirana debljina caklinskog tkiva, a to su fisure i udubine zuba (Seltzer i Bender<sup>8</sup>).

## PROBLEM

U ovom smo radu htjeli ispitati, je li emisijska spektrofotometrijska metoda prikladna za ispitivanje vrlo malih količina kalcija, koje se rastvaraju djelovanjem kiseline, iz primarnog i sekundarnog dentina. Vaganjem, prije eksperimenta, i nakon njega, ustanovio bi se stvarni gubitak težine dentinskih izbrusaka. U tu je svrhu bila upotrijebljena mliječna kiselina, s različitim pH vrijednostima, zato što je stalno prisutna u usnoj šupljini, a u patološkim stanjima ima važnu ulogu, kao destruktivni agens.

## METODA RADA

Svježe ekstrahirani, kariozni, abradirani, ili zdravi zubi, osoba starijih od 50 godina, pohranjeni su u polietilenske bočice, s dejoniziranom vodom.

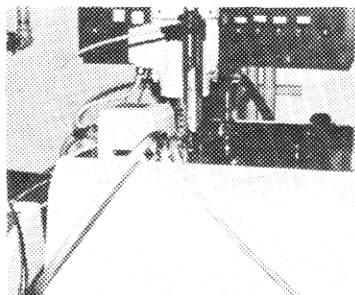


Sl. 1. Eksikator.

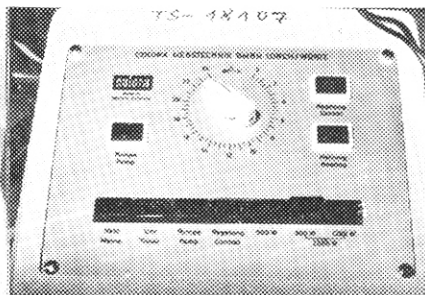
Uz stalno hlađenje destiliranom vodom, zubi su bili poprečno rezani karborund kolutima, iznad područja pulpne komore, sredinom i ispod dna pulpne komore, kako bi se dobila što veća količina sekundarnog i dijelom sklerotičnog dentina. Od tako dobivenog poprečnog reza, debljine oko 1 mm, odstranjeno je karborundnim kamenčićem caklinsko tkivo i dio primarnog dentina, sve do granice sekundarnog dentina.

Istim se postupkom dobio uzorak iz primarnog dentina. Dobiveni komadići sekundarnog i primarnog dentina, bili su oprani u dejoniziranoj vodi, da bi se uklonio detritus s njihovih površina, lagano osušeni filter papirom, a zatim umotani u polietilensku foliju »p a r a f i l m«.

Komadići dentina su nakon toga bili smješteni u obilježene kremene epruvete, postavljene otvorene u eksikator. Sušilo se u vakuumu 5,5 sati, uz polsatno pumpanje (sl. 1).



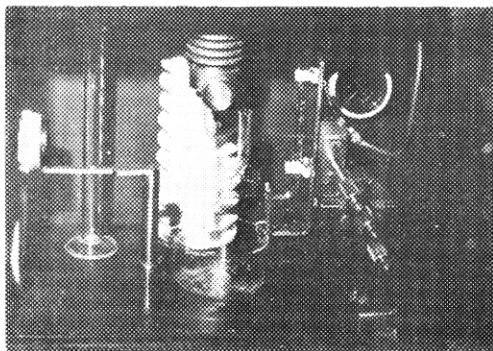
2



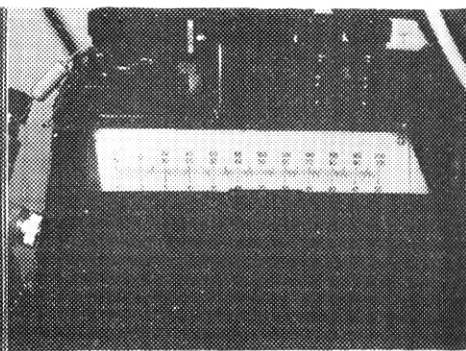
3

Sl. 2. Ultratermostat. — Sl. 3. Satni mehanizam ultratermostata.

Tako isušeni izbrusci dentina su bili izvagani na Mettlerovoj poluautomatskoj petodecimalnoj vagi. Zatim su bili vraćeni u kremene epruvete, u koje je bilo naliveno 3,8 ml mliječne kiseline, s vrijednostima pH 2,75 i 6,70 (tab. 1). Epruvete nisu bile punjene do vrha kiselinom, da bi se mogle mučkati u eksperimentu. Sve su epruvete nakon toga bile zatvorene polietilenskim čepovima i postavljene na stalak u ultratermostatu, koji je bio trajno izložen brzom turbulentnom strujanju vode, kako bi se u njemu postiglo što brže izjednačivanje temperature fluida (sl. 2, 3). Ovo strujanje fluida je također ubrzalo otapanje kalcija iz dentina, uslijed vibracije epruveta. U vrijeme eksperimenta, ultratermostat je bio svakodnevno kontroliran: satni mehanizam, temperatura, a epruvete su se često mučkale. Cijeli postupak polagane demineralizacije je trajao 34 dana, pri konstantnoj temperaturi od  $38 \pm 0,05^\circ \text{C}$ .



4



5

Sl. 4. Spektralni izvor ESF-metra. — Sl. 5. Galvanometar.

Upotrijebili smo kremene epruvete, jer smo željeli izbjeći otapanje kalcija iz staklenih epruveta, djelovanjem mliječne kiseline.

Ispitivanja su bila obavljena na emisijskom spektrofotometru (ESF) IRB 2, uz direktno dotjecanje analiziranog uzorka u spektralni izvor (sl. 4). Električni izboj se uspostavlja između površine otopine i metalne elektrode, pomoću visokog napona. Svjetlost iz spektralnog izvora se monokromira pomoću uskopojasnog interferencijskog filtra, a intenzivnost spektralne vrpce kalcija se mjeri pomoću fotomultiplikatora. Signal fotomultiplikatora, koji je proporcionalan intenzitetu vrpce, očitava se s multifleks galvanometra (sl. 5). Osjetljivost ESF-a je bila određena pomoću otopina poznate koncentracije (baždarni dijagram).

Iz koncentrirane 1M otopine kalcija, koja je bila pripremljena otapanjem 0,55 g kalcijevog hidroksida u dejoniziranoj vodi (250 ml), bile su priređene slijedeće molarne koncentracije: 0,0001, 0,00015, 0,0005, 0,0015, 0,003.

Tim je otopinama bila dodana jedna kap koncentrirane solne kiseline, radi povećanja električke vodljivosti. Baždarni dijagram za kalcij je bio izražen kao odnos signala galvanometra u mikroamperima ( $\mu$  A) prema koncentraciji kalcija u otopinama (preračunato u  $\mu$  g). Na temelju podataka iz baždarnog dijagrama i signala koji je dobiven za pojedine uzorke, određuje se koncentracija kalcija u ispitivanim uzorcima.

Bilo je ukupno devet kremenih kušalica, koje su bile razdijeljene u dvije skupine: u prvoj su bile 4 obilježene epruvete s primarnim, a 3 sa sekundarnim dentinom. Posljednje su dvije epruvete bile kontrolne.

1. skupina: prva je epruveta sadržavala primarni dentin sasvim mlade osobe, a u ostale 3 epruvete su se nalazili komadići primarnog dentina starijih osoba.

2. skupina: prve su dvije epruvete sadržavale sekundarni dentin, dok je u trećoj bio sklerotični dentin (tab. 1).

Redni broj	Oznaka epruvete	pH mliječ. kisel.	Zub	Broj komadića dentina	Tež/g
I	Pd/m	2,75	molar	3 veća	0,17319
II	Pd/1	6,70	molar	1 veći	0,06699
III	Pd/2	2,75	molar	1 veći	0,12544
IV	Pd/3	2,75	molar	1 veći + 2 sitna	0,09328
V	Sd/1	2,75	molar	1 veći	0,08743
VI	Sd/2	6,70	molar	1 veći	0,10098
VII	Skd/3	2,75	molar	1 veći i nešto sitnih	0,09618
VIII	A	6,70	mliječ. kiselina		
IX	B	2,75	mliječ. kiselina		

Tab. 1.

Eksperiment je bio prekinut nakon 34 dana, i istog su dana bili izvađeni komadići dentina iz epruveta, oprani u dejoniziranoj vodi, osušeni i stavljeni u eksikator. U svaku smo epruvetu dodali 1 kap koncentrirane solne kiseline, radi električke

vodljivosti, dobro promučkali i ispitali vrijednosti kalcijevih iona emisijskim spektrofotometrom.

Redni broj	Oznaka epruvete	pH mliječ. kiseline	Komadići dentina	Tež/g nakon eksp.	Razlika tež/mg	% otop. tvari	Ca/ $\mu$ g	% otop. kalc.
I	Pd/m	2,75	3 velika	0,16883	4,36	2,5	528,2	12,1
II	Pd/1	6,70	1 veći	0,06527	1,72	2,6	104,6	6
III	Pd/2	2,75	1 veći	0,12270	2,74	2,2	104,5	6
IV	Pd/3	2,75	1 veći i 2 sitna	0,09173	1,55	1,7	212,8	13,7
V	Sd/1	2,75	1 veći	0,08446	2,97	3,4	0,76	u tragovima
VI	Sd/2	6,70	1 veći	0,09916	1,82	1,8	0,38	u tragovima
VII	Skd/3	2,75	1 veći i nešto sit.	0,09380	2,38	2,5	475	20
VIII	A	2,75						u tragovima
IX	B	6,70						

Tab. 2.

Komadiće dentina smo ponovno sušili u vakuumu 5,5 sati, s polsatnim pumpanjem. Nakon sušenja u vakuumu, izbrusci dentina su bili ponovno izvagani na Mettlerovoj vagi. Odbijanjem sadašnje težine od ranije dobili smo razliku izraženu u miligramima (tab. 2).

## REZULTATI

1. skupina: U epruveti (Pd/m), koja je imala komadiće dentina mlade osobe, pH mliječne kiseline je bio 2,75. Ovaj je mladi dentin izgubio 4,36 miligrama na težini, tj. 2,5% svoje početne težine. Količina kalcija ispitana na emisijskom spektrofotometru (ESF) iznosila je 528,2 mikrograma, što je oko 12% ukupne otopljene tvari.

Sadržaj kušalice Pd/1, nakon eksperimenta, pokazao je gubitak težine 1,72 mg, tj. 2,6% početne težine. Količina rastvorenog kalcija je iznosila 104,6  $\mu$ g, što je 6% od otopljene tvari.

U epruveti Pd/2 demineraliziralo se 2,74 mg supstancije, što iznosi 2,2% od njene početne težine. Kalcija je bilo 104,5  $\mu$ g, a to je 6% otopljene tvari.

U epruveti Pd/3 demineraliziralo se ukupno 1,55 mg, tj. 1,7% težine izbrusaka, od toga se rastvorilo 212,8  $\mu$ g kalcija (13,7%).

2. skupina. Sekundarni dentin, sa oznakom Sd/1, nakon eksperimenta je izgubio na težini 2,97 mg, tj. 3,4% početne težine. Vrijednosti kalcija u ovoj epruveti, kao i u epruveti Sd/2, bile su u tragovima.

Posljednja epruveta Sd/3, sa sklerotičnim dentinom, pokazala je gubitak dentinske supstancije od 2,38 mg, a to je 2,5% ukupne težine dentina. Kalcija se rastvorilo 475  $\mu$ g, odn. 20% otopljene tvari.

Sama mliječna kiselina je pokazala stanoviti otklon na galvanometru pa je, prilikom pripremanja uzoraka, bilo uzeto u obzir, da koncentracija mliječne kiseline bude u određenim granicama, tako da se pogreške uvjetovane njenom prisutnošću ponište. Rezultati su prikazani na tab. 2.

## RASPRAVA I ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja su pokazali, da se emisijskom spektrofotometrijskom metodom može dokazati prisutnost kalcijevih iona u jako niskim koncentracijama i u maloj količini uzoraka.

Zapažen je najveći gubitak na težini primarnog dentina mlade osobe; on je iznosio 4,36 mg. Usporedo s gubitkom težine, rastvorena je veća količina kalcijevih iona; ona je iznosila 528,2  $\mu$ g.

Ako se ovaj primarni dentin usporedi sa starijim dentinom iz epruvete Pd/2, mogu se vidjeti razlike između gubitka težine i vrijednosti kalcijevih iona (tab. 2).

Ako je riječ o sekundarnom dentinu Sd/1 i Sd/3, a uz iste vrijednosti pH (2,75), s približno jednakom težinom, pokazala se veća razlika u dekalcinizaciji. U epruveti Sd/1, vrijednosti kalcija su bile nađene u tragovima (0,76  $\mu$ m), dok je u epruveti Sd/3 bilo 475  $\mu$ g kalcija.

Može se pretpostaviti, da je do pojačanog otapanja kalcija iz ovog posljednjeg dentina došlo zbog prisutnosti većeg dijela sklerotičnog dentina.

Ako se analiziraju sadržaji epruveta Sd/1 i Sd/2, približno jednake težine, a različite vrijednosti pH mliječne kiseline, opažamo, da je u prvom uzorku došlo do većeg gubitka na težini (2,97 mg), nego u drugoj epruveti, koji je iznosio 1,82 mg od početne težine. Vrijednosti kalcijevih iona u obim epruvetama nisu bile bitne.

Za proistekle razlike u težini dentinskog tkiva, moglo bi se reći, da je odgovorna nejednaka površina ploha, na kojoj se vrši demineralizacija. Naime, u ovom radu nije se mjerila površina pojedinog komadića dentina, već samo njihova težina. Budući da se demineralizacija vrši na cijeloj površini uzorka, može se dogoditi, da uz jednaku težinu djelovanje vodikovih iona ne bude jednakomjerno izraženo na datom izbrusku, radi različite površine.

Zbog toga se ne može sa sigurnošću tvrditi, da je dobivena količina kalcija, u odnosu na koncentraciju vodikovih iona sekundarnog i primarnog dentina, potpuno točna, dok god se ne uzme u obzir i površina uzoraka, kao jedan od bitnih parametara, koji sudjeluju u procesu demineralizacije.

Pri određivanju temperature i koncentracije vodikovih iona, nije bilo poteškoća. Međutim, u priređivanju uzoraka se pokazalo, da iz tehničkih razloga nismo mogli izbrusiti iste težine i iste površine uzoraka.

Da bi se mogli uspoređivati rezultati pojedinih uzoraka, trebalo bi standardizirati sve parametre koji sudjeluju u procesu demineralizacije, a to su: temperatura, težina, vrijednost pH i površina izbrusaka.

Das Experiment erfolgte am primären, sekundären und an einem Stückchen von jungem Dentin. Die Autoren betonen dass es nötig ist ausser den pH-Werten, der Temperatur und des Gewichts auch die Dentinoberfläche zu berücksichtigen, da die Oberfläche ein wichtiger Faktor im Prozess der Dentindemineralisation ist.

Aufgrund der erhaltenen Resultate beschliesst der Autor, dass die emissions spektrofotometrische Methode für die Bestimmung von sehr niedrigen Ca-Ionen-Konzentrationen aus sehr kleinen Mustern, geeignet ist.

## LITERATURA

1. SYMONS, N. B. B.: Dentin and Pulp, S. Livingstone, Edinburgh, 1968
2. LANGELAND, K., DOWDEN, W. E., TRONSTAD, L., LANGELAND, K. L.: Oral Surg., 32:943, 1971
3. BERNICK, S.: Oral Surg., 33:983, 1972
4. TRONSTAD, B. L., MJÖR, J. A.: Oral Surg., 33:961, 1972
5. SAUERWEIN, E.: Kariologie, G. Thieme, Stuttgart, 1974
6. NJEMIROVSKIJ, Z. Endodoncija, Izd. zavod JAZU, Zagreb, 1974
7. SCOTT, J. H., SYMONS, N. B. B.: Introduction to Dental Anatomy, Churchill Livingstone, Edinburgh-London, 1974
8. SELTZER, S., BENDER, J. B.: The Dental Pulp, J. B. Lippincott, Philadelphia-Toronto, 1975
9. JENKINS, G. N. The Physiology and Biochemistry of the Mouth, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London-Edinburgh-Melbourne, 1978
10. PHILLIPAS, G. G.: J. Dent. Res., 46:1002, 1967
11. MCGHEE, W. H. O., A Textbook of Operative Dentistry, Blakiston Company, Philadelphia, 1945
12. PHILLIPAS, G. G., APPELBAUM, E.: J. Dent. Res., 45:778, 1966
13. PHILLIPAS, G. G., APPELBAUM, E.: J. Dent. Res., 47:5, 1968
14. HANDELMAN, S. L., WASHPURN, F., WOPPERER, P. J.A.D.A., 93:967, 1967
15. BRÄNNSTRÖM, M., LINDEN, L. A., JOHANSON, G. J. Dent. Res., 47:291, 1968
16. MCKAY, G. S.: Arch. Oral. Biol., 21:51, 1976