

Zavod za dentalnu patologiju
 Stomatološkog fakulteta, Zagreb
 predstojnik Zavoda prof. dr. Z. Njemirovskij
 Odjel za rad na području virusa
 Imunološkog zavoda, Zagreb
 direktor Zavoda prof. dr. Ikić

Toksičnost helatora za stanične elemente in vitro

13u 75

D. NAJŽAR-FLEGER i S. SMERDEL

UVOD

Poznato je da uspjeh endodontskog liječenja zubi ovisi o egzaktno tretiranom korijenskom kanalu i stanju apikalnog parodontnog tkiva, poslije zahvata na zubu. Stoga je potrebno da kod endodontskog rada izvršimo temeljitu mehaničku intrakanalnu instrumentaciju i odgovarajući izbor medikamenata, kako ne bi došlo do oštećenja tkiva odgovornih za reparatorni mehanizam.

Posebnu i vrlo važnu skupinu sačinjavaju sredstva pomoću kojih vršimo otapanje anorganske supstracije i olakšavamo mehaničku instrumentaciju.

Sredstva za otapanje dentina do nedavna su bila organske i anorganske kiseline. Iako je topljivost dentina u anorganskim kiselinama vrlo visoka, one su brzo izostavljene iz upotrebe jer je pri njihovoj upotrebi dolazilo do jake iritacije apikalnog parodontnog tkiva, (N j e m i r o v s k i j¹).

Iz tog razloga su se umjesto njih počeli upotrebljavati tetracemini, aktivnost kojih se očituje u helacijskom djelovanju. Tetracemin je etilen diamin, na koji su vezane četiri molekule octene kiseline, a skraćeno se piše EDTA. On je netopljiv u vodi, ali stvara u vodi topljive natrijeve soli, kojih je primjena vrlo raznolika.

U ovakvom obliku se EDTA upotrebljava kao antidot pri otrovanjima teškim metalima (D u r a k o v i ć²), u histološkoj tehnici za demineralizaciju tvrdih tkiva, a pri produkciji linijskih staničnih kultura za proces versenizacije. U studiju patogeneze dentalnog karijesa in vitro, često se primjenjuje u svrhu demineralizacije cakline.

Uspješnu primjenu helacijskog fenomena u svrhu demineralizacije dentina u korijenskom kanalu pri endodontskom zahvatu opisuju među prvima Ö s t b y³.



Zadovoljavajući klinički rezultati pospješili su proizvodnju komercijalnih preparata za endodontsku upotrebu. Oni se međusobno razlikuju po stupnju neutralizacije EDTA i u vezi s time im se razlikuje koncentracija vodikovih iona. Tako je Östbyjev preparat imao $\text{pH } 7,7$, Calcinase (Lege artis) i Largal (Septodont) $\text{pH } 7,3$, dok Helator (Apoteka Kliničkih bolnica, Ljubljana) ima $\text{pH } 7,05$,

Nekim preparatima kao na primjer Largalu dodani su antiseptici. EDTA, naime, u koncentraciji vodikovih iona, kakva je u komercijalnim preparatima za endodonciju ne pokazuje baktericidno djelovanje, iako je ono opisano kod $\text{pH } 5$ (Kotula⁴).

Mehanizam i kliničko djelovanje helatora na tvrda tkiva zubi opisani su i poznati, a mekana tkiva, kako pokazuju klinička iskustva, dobro ga podnose (Logarištin⁵, Popić⁶).

Mehanizam djelovanja helatora na mekana tkiva, pretpostavljamo, sličan je djelovanju versena (natrijeva sol EDTA, $\text{pH } 7,3$), koji se upotrebljava za disperziju stanica u pripremanju linijskih staničnih kultura (Hoskins⁷). Aktivnost versena ovisi o sposobnosti da se veže s divalentnim kationima kalcijem i magnezijem. Budući da kalcij igra važnu ulogu u povezivanju živih stanica, njegovo uklanjanje pomoću versena rezultira gubitkom kohezije i stanice se odijele jedna od druge.

ZADATAK

Promjene na mekim tkivima zubne supstancije uslijed djelovanja helatora studirao je Vrbic⁸. Kako je na rezultate njegova ispitivanja mogla utjecati trauma, potaklo nas je da ispitamo citotoksičko djelovanje helatora na stanice in vitro.

Poznato je da natrijeve soli EDTA slično djeluju na kulture tkiva kao ferment tripsin (Harris⁹). To je bio razlog da ispitamo proteolitsko djelovanje tog preparata.

Prema tome, naš zadatak je bio da:

1. odredimo toksične doze helatora za kulturu HeLa stanica,
2. ispitamo proteolitsko djelovanje helatora.

Kao medij za ispitivanje upotrijebili smo kulturu HeLa stanica, jer je ona već poslužila za testiranje toksičnosti preparata, koji se upotrebljavaju u endodonciji (Engström i Spångberg¹⁰; Rappaport i sur.¹²).

MATERIJAL I METODA

Helator je di i tri natrijeva sol etilen diamin tetra octene kiseline (EDTA), čiji je $\text{pH } 7,05$ a izrađuje ga Centralna ljekarna Kliničkih bolnica u Ljubljani,

Kultura HeLa stanica je linijska kultura heteroploidnih stanica uzgojena iz karcinoma uteri čovjeka. Održavanje kultura je vršeno pasažama HeLa stanica, koje su porasle u jednom sloju u hranljivoj podlozi po Eagleu sa 10% telećeg seruma, pri temperaturi od 37°C , a prethodno su raspršene pomoću sterilne 0,25% otopine tripsina (Difco, 1:250 otopljenom u fosfatnom puferu, $\text{pH } 7,2$). Kultura se održava mijenjanjem hranilišta svaka tri do četiri dana i pasa-

žama jedanput tjedno u omjeru 1 : 2, to jest iz jedne kulture priređuju se dvije nove (Pa u I³).

Određivanje toksičnih doza helatora za kulturu hela stanica

Preliminarna titracija

U nizu od 7 epruveta napravljena su desetorostruka razrjeđenja helatora (10^{-1} do 10^{-7}) s hranjivom podlogom bez seruma. Ona su simultano inokulirana u suspenziju HeLa stanica sa 2% telećeg seruma, koncentracije 50 000 ml, u omjeru 0,1 ml svakog razrjeđenja helatora i 0,9 ml suspenzije HeLa stanica.

Stanice su inkubirane pri temperaturi od 37° C, a nakon 24 sata izvršena je kontrola, da bismo ispitali dolazi li do toksičkog djelovanja helatora. Kao kriterij za ocjenu toksičnosti uzeli smo morfološke promjene na stanicama, kao što su stvaranje granulacija i skvrčavanje stanica.

Na temelju rezultata preliminarne titracije, izračunali smo minimalnu citotoksičnu dozu (KTD₅₀).

Nakon toga smo izvršili inokulaciju helatora na poraslu kulturu HeLa stanica.

Inokulacija helatora na poraslu kulturu hela stanica

U nizu od 9 epruveta napravljena su razrjeđenja helatora od 1 : 10, 1 : 15, 1 : 21, 1 : 31, 1 : 41, 1 : 51, 1 : 61, 1 : 71, 1 : 100 s hranjivom podlogom bez seruma. Ona su inokulirana u kulturu HeLa stanica, staru 24 sata, poraslu u jednom sloju, u omjeru 0,2 ml., svakog razrjeđenja helatora i 1,8 kulture HeLe. Upotrijebljen je medij za održavanje kulture sa 2% telećeg seruma.

Kulture su inkubirane pri temperaturi od 37° C. Kontrola je vršena nakon 24, 48, odnosno 72 sata nakon inokulacije, da bi se ispitalo citotoksično djelovanje helatora.

Ispitivanje proteolitskog djelovanja helatora

U svrhu ispitivanja proteolitskog djelovanja helatora, upotrijebili smo linijsku kulturu HeLa stanica i koncentrirani helator u omjeru 0,1 ml helatora i 0,9 ml HeLe te medij za održavanje kulture s 2% telećeg seruma. Tijek dezintegracije međustanične supstancije pratili smo pod mikroskopom od nulte do dvadesete minute, a mikrofotografiranje smo izvršili u intervalu od dvije do tri minute.

Da bismo ustanovili kolika je uloga kalcija i magnezija pri digestiji međustaničnih veza, umjesto medija za održavanje kulture po Eagle u upotrijebili smo fosfatni pufer (PBS), koji nije sadržavao kalcijeve i magnezijeve ione uz koncentraciju vodikovih iona 7,2.

U nizu od tri epruvete napravljena su desetorostruka razrjeđenja helatora (1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000) sa fosfatnim puferom (PBS) u omjeru 1,8 ml PBS-a i 0,2 ml helatora. Tako priređena razrjeđenja inokulirana su na poraslu kulturu HeLa stanica staru 24 sata.

Radi određivanja vijabilnosti stanica upotrijebljeno je tripansko modriilo (0,1%).

viabiln. sposobnost af. do 51%

REZULTATI I DISKUSIJA

Toksične doze helatora za kulturu HeLa stanica ustanovili smo preliminarnom titracijom u suspenziji stanica, na temelju koje smo izračunali KTD_{50} .

Nakon toga smo izvršili inokulaciju helatora na linijsku kulturu HeLa stanica, staru 24 sata, da bismo odredili minimalnu citotoksičnu dozu.

Tijek dezintegracije međustaničkih veza pratili smo u Eagleovom mediju (EME), koji je sadržavao kalcijeve i magnezijeve ione (pH 7,2) i PBS-u (pH 7,2), koji nije sadržavao spomenute ione, ali im je koncentracija vodikovih iona bila jednaka i iznosila je pH 7,2.

Rezultati ovog ispitivanja su slijedeći:

Određivanje toksičnih doza helatora za kulturu HeLa stanica

Preliminarna titracija

24 sata nakon simultane inokulacije helatora, razrijeđenog od 10^{-1} do 10^{-7} i suspenzija HeLa stanica, nalazimo toksično djelovanje u razrjeđenju helatora od 10^{-1} (tab. 1).

RAZRJEĐENJE HELATORA							
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
A	3	0	0	0	0	0	0
B	3	3	3	3	3	3	3

A = Broj epruveta, u kojima su uočene morfološke promjene stanica.

B = Broj epruveta inokuliranih istim razrjeđenjem helatora.

Tab. 1. Preliminarna titracija toksičnosti desetorostrukih razrjeđenja helatora za kulturu HeLa stanica, 24 sata nakon simultane inokulacije.

Teoretsku minimalnu citotoksičnu dozu (KTD_{50}) izračunali smo na temelju preliminarne titracije, a pomoću formule po Karberu (Jawetz¹⁴). Nju nalazimo u razrjeđenju helatora od 1 : 61.

Inokulacija helatora na poraslu kulturu HeLa stanica

Granično citotoksičko djelovanje helatora na poraslu kulturu HeLa stanica došlo je do izražaja u razrjeđenju helatora od 1 : 61 (0,016%). U većim razrjeđenjima helatora nije opaženo toksično djelovanje na kulturu HeLa stanica poraslu u jednom sloju, niti nakon 72 sata (tabela 2).

RAZRJEDENJE HELATORA									
	1:10	1:15	1:21	1:31	1:41	1:51	1:61	1:71	1:100
A	3	3	3	3	3	3	3	0	0
B	3	3	3	3	3	3	3	3	3

A = Broj epruveta u kojima je uočeno citotoksičko djelovanje helatora.

B = Broj epruveta inokuliranih istim razrjeđenjem helatora.

Tab. 2. Titracija toksičnosti razrjeđenja helatora za kulturu HeLa stanica poraslu u jednom sloju, 72 sata nakon inokulacije.

Ispitivanje proteolitskog djelovanja helatora

Proteolitsko djelovanje helatora na međustanične veze kultura HeLa stanica, u omjeru 0,1 ml helatora i 0,9 ml kulture HeLa stanica u EME sa 2% telećeg seruma, dogodilo se u intervalu od 10 minuta (sl. 1, 2).

Na mikrofotografijama možemo uočiti, da su nakon inokulacije koncentriranog helatora (1:10) poligonalne epiteloidne stanice izrazito promijenile svoju morfologiju. Opažamo zgusnuće unutarnje strukture stanica, tako da se ne mogu uočiti jezgre i nukleole. Stanice poprimaju oblik kugle. Dolazi do izražaja i dezintegracija međustanične supstancije.

Proteolitsko djelovanje helatora na međustaničnu supstanciju kulture HeLa stanica u fosfatnom puferu (PBS), koji nije sadržavao kalcijeve i magnezijeve ione, odvijalo se na isti način kao u Eagleovom mediju (EME) (tab. 3). Koncentracija vodikovih iona bila je u oba medija jednaka i iznosila je 7,2

RAZRJEDENJE HELATORA					
			1:10	1:100	1:1000
HELA	HELATOR	U MEM	+	—	—
		U PBS	+	—	—

EME = Eagleovo hranilište sa kalcijevim i magnezijevim ionima, pH 7,2.

PBS = Fosfatni pufer bez kalcijevih i magnezijevih iona, pH 7,2.

Tab. 3. Proteolitsko djelovanje helatora u mediju s kalcijem i magnezijem (EME) i u mediju bez kalcijevih i magnezijevih iona (PBS) pri istoj koncentraciji vodikovih iona od 7,2.

Na temelju nalaza, koje smo uočili promatrajući proteolitsko djelovanje helatora u mediju s kalcijevim i magnezijevim ionima (EME) i u mediju bez tih iona (PBS), a pri jednakim pH vrijednostima (7,2) došli smo do zaključka, da je koncentracija kalcija i magnezija sporedna u odnosu na koncentraciju vodikovih iona pri disperziji staničkih kultura.

Međutim, postoji niz saznanja, na temelju kojih ne možemo zanemariti ulogu kalcija i magnezija u cijelom mehanizmu. Tako su Schultze i sur.¹⁵ ustanovili da kalcijevi ioni igraju ulogu pri inhibiciji komplementa iz humanog seruma u frakciji C₈ pomoću EDTA u hemolizi ovčjih eritrocita. On međutim ne isključuje postojanje drugih mehanizama, koji su nam još nepoznati, a koji su se mogli naslutiti u njegovom eksperimentu pri ispitivanju komplementa u ostalim frakcijama (C₁ do C₉).

Nadalje je poznato, da se versen (natrijeva sol EDTA, pH 7,2) ne može upotrijebiti za disperziju primarnih staničnih kultura, jer nije u stanju razgraditi intersticijsko tkivo organa, radi izobilja kalcijevih i magnezijevih iona u ekstracelularnoj tekućini, tako da proces helacijskog djelovanja ne može u takvoj sredini doći do izražaja. Kod linijskih staničnih kultura postoji vrlo tanak sloj međustanične supstancije, koja se brzo dezintegrira pod djelovanjem versena, ali tek u mediju bez kalcija i magnezija. U takvoj sredini helacijski fenomen dolazi do punog izražaja i dovodi do disperzije linijskih staničnih kultura.

Iz toga proizlazi da je za helacijsko djelovanje potrebna mala količina kalcijevih i magnezijevih iona te da ih helator u linijskim staničkim kulturama u mediju bez kalcijevih i magnezijevih soli izvlači iz međustanične supstancije i intracelularne tekućine (Najar-Flieger¹⁶).

Kako je helator po svojim bioaktivnim svojstvima sličan versenu, analogijom možemo rastumačiti njegovu netoksičnost na tkiva apikalnog paradonta. Zbog izobilja kalcija i magnezija, helator je blokiran spomenutim ionima iz ekstracelularne tekućine i time onemogućen, da djeluje toksički na stanice tkiva.

U najnovijem radu, koji se odnosi na patogenezu karijesa in vitro, uočena je važnost koncentracije vodikovih iona kod primjene EDTA (Johnson i sur.¹⁷). Mikrofotografska ispitivanja su pokazala, da defekti na caklini pod djelovanjem EDTA s koncentracijom vodikovih iona od pH 5 odgovaraju svojim oblikom defektima nastalim uslijed djelovanja anorganskih kiselina. Oni se očituju u demineralizaciji centralnih dijelova caklinskih prizama. Pri neutralnoj reakciji, EDTA djeluje drugačije na površinu cakline. Demineralizirano područje se nalazi na periferiji caklinskih prizama, dok im centralni dijelovi ostaju neoštećeni. Istu sliku pokazuje mliječna kiselina, kad je njena disocijacija onemogućena glicerolom.

Kako ultrastruktura inicijalnog karijesa odgovara svojim izgledom slici opisanoj pri djelovanju EDTA neutralne reakcije u eksperimentu, autori postavljaju pitanje, je li moguće, da helacijsko djelovanje dolazi do izražaja u području interprizmatске supstancije, što je važno za patogenezu dentalnog karijesa.

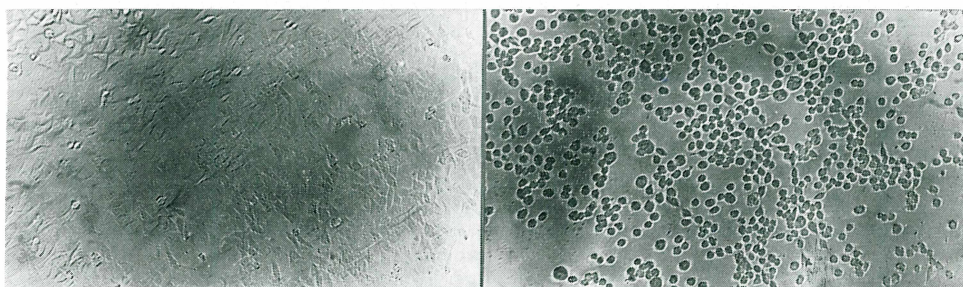
Budući da je ultrastruktura cakline specifična i da se metabolički procesi u caklini ne odigravaju na isti način kao u ostalim tkivima organizma, ne treba očekivati da će interprizmatска supstancija reagirati na djelovanje EDTA kao međustanična supstancija ostalih tkiva. Ona po svojoj reakciji može biti bliža međustaničnoj supstanciji linijskih staničnih kultura.

Kako su intercelularne veze kulture HeLa stanica vrlo osjetljive na djelovanje helatora pri neutralnoj reakciji (1:61), možemo pretpostaviti, da će interprizmatсke veze biti osjetljivije na EDTA neutralne reakcije, nego li caklinske prizme, jer gustoća cakline ne igra dominantnu ulogu pri demineralizaciji uslijed djelovanja EDTA (Johnson i sur.¹⁷).

pH = 4 pH
> 4 pH
< 8 pH
4

Na temelju ovih pretpostavaka i mikrofotografskih nalaza Johnsona i sur.¹⁷ o reakciji cakline na EDTA neutralne reakcije, možemo prihvatiti misao, da helacijsko djelovanje dolazi prije do izražaja na interprizmatskoj supstanciji, nego li na samim prizmama pri dentalnom karijesu.

Zaključno možemo navesti, da razlike u djelovanju helatora u vezi sa odnosom kalcijevih i magnezijevih iona te koncentracije vodikovih iona ne igraju bitnu ulogu u uvjetima gdje helator dolazi u dodir s tkivnom tekućinom, kao što je to slučaj u području apikalnog parodonta te one nemaju neko značenje za praktičnu endodonciju. Smatramo, da bi trebalo voditi više računa o caklini



Sl. 1. Kultura HeLa stanica poraslih u jednom sloju, stara 48 sati, netretirana, nativno, x 437,5. To je izgled kulture normalnih poligonalnih epiteloidnih stanica. — Sl. 2. Kultura HeLa stanica poraslih u jednom sloju, stara 48 sati, 10 minuta nakon dodavanja helatora (1:10), nativno, x 437,5. Stanice su promijenile svoju morfologiju i poprimile oblik kugle, uslijed dezintegracije međustaničke supstancije i zgsnuća unutarnje strukture, pod djelovanjem helatora.

krune koja može biti izložena djelovanju helatora čitavo vrijeme instrumentacije. Trebalo bi ispitati da li helator, i u kojoj mjeri, izaziva dezintegraciju površine cakline, nakon endodontskog zahvata i dosljedno tome osigurati zaštitu zubne krune prije primjene helatora.

ZAKLJUČAK

Na temelju titracije helatora (ph 7,05) u raznim razrjeđenjima na linijsku kulturu HeLa stanica, a s ciljem da odredimo minimalnu citotoksičnu dozu i ispitivanja proteolitskog djelovanja helatora u mediju s kalcijevim i magnezijevim ionima i bez njih, pri jednakim ph vrijednostima (7,2) možemo zaključiti:

1. Minimalna citotoksična doza helatora za linijsku kulturu HeLa stanica u koncentraciji od 50 000 ml vrlo je niska i nalazimo je u razrjeđenju helatora od 1 : 61 (0,016%).

2. Proteolitsko djelovanje helatora na međustaničnu supstanciju kulture HeLa stanica u fosfatnom puferu (PBS), koji nije sadržavao kalcijeve i magnezijeve ione, odvijalo se na isti način kao u Eagleovom mediju (EME), u kojemu nalazimo spomenute ione. Oba medija su imala istu koncentraciju vodikovih iona (ph 7,2).

Iz toga smo izveli zaključak da uz istu koncentraciju vodikovih iona za proteolitsko djelovanje helatora na linijsku kulturu HeLa stanica nije bitna pri-

sutnost kalcija i magnezija u mediju, jer potrebnu količinu spomenutih iona za odvijanje helacijskog procesa helator crpi iz međustanične supstancije.

Za praktičnu endodonciju nije bitan nalaz koji se odnosi na djelovanje helatora u vezi s prisutnošću kalcijevih i magnezijevih iona te koncentracije vodikovih iona, jer u području apikalnog parodonta on dolazi u dodir s tkivnom tekućinom, koja promptno blokira aktivnost helatora. Ovaj nalaz je važniji za studij helacijskog fenomena na tkivo cakline, jer pokazuje, da uslijed velike osjetljivosti tkiva na helator (1:61), može brzo doći do dezintegracije interprizmatске supstancije, jer gustoća cakline nije bitna za cijeli mehanizam.

S gledišta praktičara, to bi značilo, da treba osigurati zaštitu zubne krune prije primjene helatora.

S a ž e t a k

Autori su ispitali citotoksičnost helatora (di- i tri- natrijeva sol EDTA, pH 7,05, Centralne ljekarne kliničkih bolnica u Ljubljani) na linijsku kulturu HeLa stanica in vitro. Najprije su odredili titracijom helatora u raznim razrjeđenjima minimalnu citotoksičnu dozu za kulturu HeLa stanica (50 000 ml) u EME, koja je nađena u razrjeđenju od 1:61. Zatim su ispitali ulogu kalcijevih i magnezijevih iona na tijek dezintegracije međustanične supstancije kulture HeLa stanica, u mediju s kalcijevim i magnezijevim ionima (EME) i bez spomenutih iona (PBS) pri jednakim pH vrijednostima (pH 7,2).

Rezultati pokazuju da se dezintegracija međustaničnih veza odvijala pri istom pH na identičan način, bez obzira na prisutnost kalcija i magnezija u hranljivom mediju. Na temelju toga izveden je zaključak, da je za helacijsko djelovanje potrebna mala količina kalcijevih i magnezijevih iona te da ih u mediju bez tih iona, helator izvlači iz međustanične supstancije i samih stanica.

Nadalje se spominje, da bi ovi rezultati mogli biti važni za studij helacijskog fenomena na tkivo cakline, jer pokazuje, da uslijed velike osjetljivosti tkiva na helator (1:61), može brzo doći do dezintegracije interprizmatске supstancije, jer gustoća cakline nije bitna za cijeli mehanizam.

S u m m a r y

THE TOXICITY OF CHELATOR ON CELL ELEMENTS IN VITRO

The cytotoxicity of chelator and NaEDTA with a, pH of 7,05 — (Central Pharmacy of the Clinical Hospitals, Ljubljana) on the linear culture of He-La cells in vitro was investigated. The minimal cytotoxic dose for the He-La cells culture was at first determined by means of chelator titration in various dilutions (50 000/ml) in EME which was found in a dilution of 1:61. Subsequently the role of Calcium and Magnesium ions was investigated on the course of disintegration of intercellular substances of the HeLa cells culture in the media with calcium and magnesium ions (EME) and without the ions mentioned (PBS) at equal pH values (pH 7,2).

The results show that the disintegration of intercellular connections developed at the same pH in an identical manner regardless of the presence of calcium and magnesium in the nutritive medium. On the base of this finding the authors conclude that a small quantity of calcium and magnesium ions is necessary for the chelating activity and that in a medium without these ions the chelator extracts it from the intercellular substance and from the very cells.

The authors moreover mention that these results might be important for the study of the chelator phenomenon on the tissue of the dental enamel because it shows that on account of great sensitivity of the tissue to chelator activity (1:61) disintegration of the interprismatic substance may rapidly occur with regard to the fact that the density of the enamel is not essential for the entire mechanism.

Z u s a m m e n f a s s u n g

DIE TOXIZITÄT DES CHELATORS FÜR ZELLELEMENTE IN VITRO

Die Autoren haben die Zellgiftigkeit des Chelators (Di- und Tri-Natriumsalz EDTA, pH 7,05, Zentrale Apotheke der klinischen Krankenhäuser, Ljubljana), auf Linienkultur der HeLa Zellen in

vitro, geprüft. Vorerst wurde durch Titration des Chelators in verschiedenen Verdünnungen die minimale zytotoxische Dosis für HeLa-Zellenkultur (50000 ml) im EME, welche in der Verdünnung von 1 : 61 befunden wurde, festgestellt. Sodann wurde der Anteil der Kalzium- und Magnesiumionen auf den Verlauf der Desintegration der Zwischenzellsubstanz in der HeLa-Zellen-Kultur im Medium mit Kalzium- und Magnesiumionen (EME), und ohne der genannten Ionen (PBS), bei gleichen pH-Werten von 7,2, geprüft.

Die Resultate zeigen, dass die Desintegration der zwischenzelligen Verbindung bei gleichem pH-Wert auf die identische Art erfolgt, ohne Rücksicht auf die Anwesenheit von Kalzium und Magnesium im Nährmedium. Das weist darauf hin, dass für die Chelator-Wirkung nur eine geringe Menge von Kalzium- und Magnesiumionen nötig sind, und dass im Medium ohne diese Ionen der Chelator sie aus der Zwischenzellsubstanz und den Zellen selbst, entnimmt.

Weiters wird hervorgehoben, dass diese Resultate für das Studium der Chelator-phenomene in bezug auf das Schmelzgewebe wichtig sein könnten, weil es erwiesen ist, dass wegen der grossen Empfindlichkeit der Gewebe auf den Chelator (1 : 61), die Desintegration der interprismatischen Substanz schnell erfolgt, mit Rücksicht darauf dass die Dichte des Schmelzes für den gesamten Mechanismus nicht wesentlich ist.

LITERATURA

1. NJEMIROVSKIJ, Z.: Endodoncija, JAZU, Zagreb, 1969
2. DURAKOVIĆ, A.: Medicinar, 21:83, 1970
3. ÖSTBY, B. N.: Odont. Tidskrift, 65:1, 1957
4. KOTULA, R., BORDAČOVA, J.: Dent. Abst., 15:31, 1970
5. LOGAR, A., ŠTUCIN, D.: Zob. vestn., 18:3, 1963
6. POPIĆ, V.: Medicinar, 20:47, 1959
7. HOSKINS, J. M.: Virological procedures, Butterworths, London, 1967
8. VRBIĆ, V.: Zob. vest., 20:257, 1965
9. HARRIS, R. J. C.: Techniques in Experimental Virology, Academic Press, London-New York, 1964
10. ENGSTRÖM, B., SPÄNGBERG, L.: Acta odont scand., 25:77, 1967
11. ENGSTRÖM, B., SPÄNGBERG, L.: Acta odont scand., 25:187, 1967
12. RAPPAPORT, M. H., HADDONFIELD, N. J., KAPSIMALIS, P.: O. S., O. M. & O. P., 18:785, 1964
13. PAUL, J.: Cell and Tissue Culture, Livingstone, Edinburg-London, 1970
14. JAWETZ, E., MELNICK, J. L., ADELBERG, E. A.: Pregled medicinske mikrobiologije, Školska knjiga, Zagreb, 1969
15. SCHULTZ, D. R., ZORCO, R. M.: J. Immunol., 101:279, 1970
16. NAJŽAR-FLEGER, D.: Habilitacijski rad, Zagreb, 1971
17. JOHNSON, N. W., POOLE, D. F. G., TYLER, J. E.: Arch. Oral. Biol., 16:385, 1971