

IZVLEČEK

Za razvoj kariesa v sklenini je potreben transport kislin v in transport mineralnih gradnikov iz področja demineralizacije skozi povrhnjo intaktno skleninsko plast. Čeprav je problem izredno zanimiv s stališča fiziološke zaščite izraščajočih stalnikov, so raziskovalci pojav zmanjšane prepustnosti sklenine mlečnih zob pred izpadom osvetlili le enkrat in ugotovili, da se prepustnost sklenine mlečnih zob zmanjša med procesom resorpcije korenine. Redke raziskave na živih stalnih živalskih zobeh so pokazale, da potekajo difuzijski procesi mnogo hitreje na živih kot na izruvanih zobeh ali zobeh, ki so jim odstranili zobno pulpo, vendar so si rezultati teh študij zelo različni ali pa si celo nasprotujejo.

Z uporabo metode elektronske paramagnetne resonance (EPR) smo merili prepustnost sklenine človeških zob za vodotopni spinski označevalec. Metodo smo podprli z merjenjem količine proste vode v sklenini, ki predstavlja medij za difuzijske procese.

Skleninske vzorce smo izrezali iz enokoreninskih stalnih in mlečnih zob in jih razdelili v štiri skupine: (A) skleninski vzorci iz mlečnih zob s koreninami, resorbiranimi največ do polovice, (B) skleninski vzorci iz mlečnih zob s popolnoma resorbiranimi koreninami, (C) skleninski vzorci iz stalnih zob mlajših bolnikov, (D) skleninski vzorci iz devitaliziranih zob in (E) skleninski vzorci iz stalnih zob starejših bolnikov. V vseh skupinah vzorcev smo določili povprečne difuzijske koeficiente (D): $D(A) = 10,72 \pm 2,83 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, $D(B) = 3,22 \pm 0,66 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, $D(C) = 7,03 \pm 0,61 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, $D(D) = 5,75 \pm 0,28 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, $D(E) = 4,45 \pm 0,37 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. V skupinah smo določili tudi povprečne utežne deleže proste vode (W) s sušenjem na sobni temperaturi eno uro: $W(A) = 6,03 \pm 0,62 \%$, $W(B) = 2,04 \pm 0,16 \%$, $W(C) = 4,02 \pm 0,70 \%$, $W(D) = 3,82 \pm 0,67 \%$, $W(E) = 3,16 \pm 0,71 \%$.

Naši rezultati podpirajo ugotovitve predhodne raziskave, da je prepustnost sklenine mlečnih zob s popolnoma resorbiranimi koreninami manjša kot mlečnih zob z delno ali neresorbiranimi koreninami. Ugotovljena zmanjšana prepustnost devitaliziranih zob, skupaj z ugotovitvami o vlogi prepustnosti sklenine pri karioznem procesu, je pokazala na možnost, da so devitalizirani zobje bolj odporni proti kariesu kot živi. Rezultati dela podpirajo domneve o pomembni vlogi mlečnih zob pri fiziološki zaščiti izraščajočih stalnikov in vlogi pulpe stalnih zob pri nastanku kariesa.

ABSTRACT

It was discovered, that the initial carious lesion develops under a relatively intact superficial enamel layer. It is evident that transport of ions and molecules through the pores in the enamel structure plays an important role in the caries process. Knowledge of the transport processes in deciduous enamel during root resorption is limited. The data about the effect of devitalization of the teeth on diffusion processes in enamel offer no definitive conclusions.

In this study the transport of water soluble spin-labelled molecules through enamel was studied by electron paramagnetic resonance (EPR) and the amount of water in enamel was determined by measuring the weight during drying at room temperature. Enamel samples cut from single rooted permanent and deciduous teeth were classified into four different groups: (A) samples from deciduous teeth, (B) samples from deciduous teeth with terminal root resorption, (C) samples from permanent teeth of younger patients, (D) samples from nonvital teeth and (E) samples from permanent teeth of older patients. A set of diffusion coefficients (D) to describe the molecular transport in enamel was generated from the experimental data. For groups of enamel samples this coefficients were: $D(A) = 10,72 \pm 2,83 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, $D(B) = 3,22 \pm 0,66 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, $D(C) = 7,03 \pm 0,61 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, $D(D) = 5,75 \pm 0,28 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, $D(E) = 4,45 \pm 0,37 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. The average contents of free water (W) in groups of enamel samples evaluated by the changes in weight loss after drying the samples at room temperature for 60 minutes were: $W(A) = 6,03 \pm 0,62 \%$, $W(B) = 2,04 \pm 0,16 \%$, $W(C) = 4,02 \pm 0,70 \%$, $W(D) = 3,82 \pm 0,67 \%$, $W(E) = 3,16 \pm 0,71 \%$.

A decrease in the permeability of deciduous enamel for water soluble spin-labelled molecules during root resorption could be observed. The average diffusion coefficient in a group of permanent vital teeth was found to be larger than in a group of permanent nonvital teeth. The permeability of enamel is inversely related to the length of exposure of the tooth to oral environment. The transport processes in dental enamel are significantly affected by the amount of water available in the tissue.

KAZALO

IZVLEČEK	1
ABSTRACT	2
KAZALO	3
1. UVOD.....	3
1.1. OPIS PROBLEMA	4
1.2. DOSEDANJA SPOZNAVANJA.....	5
1.2.1. <i>Struktura sklenine</i>	5
1.2.2. <i>Anorganska snov v sklenini</i>	6
1.2.3. <i>Organska snov v sklenini</i>	7
1.2.4. <i>Prepustnost sklenine</i>	8
1.2.5. <i>Difuzijski koeficient</i>	12
2. NAMEN NALOGE	15
3. MATERIALI IN METODE.....	16
3.1. METODE DE LA	16
3.2. ZASNOVA EKSPERIMENTA	18
3.3. MATERIALI IN PRIPRAVA VZORCEV SKLENINE.....	19
3.4. MERJENJE PREPUSTNOSTI SKLENINE.....	20
3.4.1. <i>Matematični model</i>	21
3.5. DOLOČITEV KOLIČINE VODE V VZORCIH.....	24
3.6. STATISTIČNA OBDELAVA	24
4. REZULTATI	25
4.1. DOLOČITEV DIFUZIJSKIH KOEFICIENTOV V SKLENINSKIH VZORCIH.....	25
4.2. DOLOČITEV KOLIČINE PROSTE VODE V VZORCIH SKLENINE	33
5. RAZPRAVA	36
6. ZAKLJUČKI.....	41
7. ZAHVALA.....	42
8. LITERATURA	43

1.1. OPIS PROBLEMA

Sklenina je mesto začetnega karioznega procesa. Za razvoj kariesa v sklenini je potreben transport kislin v in transport skleninskih gradnikov iz področja demineralizacije. Prepustnost sklenine tako pogojuje hitrost nastanka in obsežnost kariozne lezije. Čeprav je področje raziskovanja izredno zanimivo s stališča fiziološke zaščite izraščajočih stalnikov, so raziskovalci pojav zmanjšane prepustnosti sklenine mlečnih zob pred izpadom osvetlili le enkrat (Atkinson, 1949) in ugotovili, da se prepustnost sklenine mlečnih zob zmanjša med procesom resorpcije korenine. Redke raziskave na živih stalnih živalskih zobeh so pokazale, da potekajo difuzijski procesi mnogo hitreje na živih kot na izruvanih zobeh ali zobeh, ki so jim odstranili zobno pulpo, vendar so si rezultati teh študij zelo različni ali pa si celo nasprotujejo (Tarbet in Fosdick, 1971).

1.2. DOSEDANJA SPOZNANJA

1.2.1. Struktura sklenine

Osnovni strukturni gradniki sklenine so skleninske prizme, ki potekajo od skleninsko-dentinske meje do površine sklenine, kjer se lahko končujejo z neprizemsko plastjo sklenine. Na prečnem prerezu imajo prizme "glavo" in "rep", kar opisujemo kot obliko ključavnice. Večina prizem je razporejenih tako, da so repi prizem orientirani proti skleninsko-cementni meji, glave pa proti žvečni ploskvi ali griznemu robu zobne krone (Scott in sod., 1974). Repi skleninskih prizem predstavljajo interprizmatško snov, glave skleninskih prizem pa tvorijo intraprizmatško snov ali prizme zobne sklenine. Skleninske prizme v mlečnih zobeh so približno za 2 μm tanjše kot v stalnih zobeh. Sklenina mlečnih zob je dvakrat tanjša v primerjavi s sklenino stalnih zob (Mortimer, 1970).

V vsaki skleninski prizmi je nekaj milijard mikrokristalov kalcijevega hidroksiapatita (CaHA) vloženi v organsko substanco (Scott in sod., 1974). Kristali so preferenčno orientirani, to pomeni, da so z vzdolžnimi osmi pretežno orientirani vzporedno z vzdolžno osjo prizem (Frank in sod., 1960). Bolj ko so kristali oddaljeni od centra prizem, večji je odklon te osi in slabša je njihova urejenost. Zato je najboljša urejenost kristalov v intraprizmatški snovi, najslabša pa v interprizmatški snovi zobne sklenine (Sharpe, 1967, Swancar in sod., 1970, Scott in sod., 1974, Hamilton in sod., 1973). Urejenost mikrokristalov se spreminja tudi v posameznih plasteh sklenine. Boljša naj bi bila v zunanjih dveh tretjinah sklenine (Poole in Brooks, 1961), vendar nekateri avtorji menijo, da je boljša v srednji kot v zunanji in v notranji tretjini (Lyon in Darling, 1957, Glass, 1962). Urejenost kristalov pogojuje odpornost zobne sklenine proti kariesu. V sklenini zob, ki so bili bolj odporni proti kariesu, so ugotovili višjo stopnjo urejenosti mikrokristalov (Skaleric, 1974, Cevc in sod., 1976). V povrhnji plasti sklenine so mikrokristali urejeni z vzdolžno osjo večinoma pravokotno na zunanjo površino sklenine in tvorijo plast brez prizem (Ripa in sod., 1966, Gwinet, 1967, Spiers, 1971, Skaleric, 1974, Cevc in sod., 1976). Plast brez prizem je prisotna v mlečnih in v stalnih zobeh (Ripa in sod., 1966) in je debela do 200 μm , v povprečju okrog 30 μm (Rippa in sod., 1966, Speirs, 1971). Ugotovili so tudi, da je zunanja plast sklenine bolj mineralizirana (Hofman in sod., 1969), rentgensko gostejša

(Gwinet, 1966, Gwinet, 1967), trša in specifično težja (Thewlis, 1940) kot drugi deli sklenine. Velikost mikrokristalov je eden od dejavnikov, ki vplivajo na fizikalne in kemične lastnosti sklenine. Manjši kristali imajo večjo specifično površino kot večji in so zato bolj reaktivni in bolj topni (Brudevold in Söremark, 1967). V fluorotični sklenini so našli večje kristale kot v sklenini, ki je vsebovala povprečno koncentracijo fluora (Kerebel in sod., 1976). V vzorcih sklenine, ki so bili odporni proti jedkanju, so našli dvakrat večje mikrokristale kot v neodpornih vzorcih sklenine (Besic in sod., 1975). Na prečnem prerezu kažejo kristali heksagonalno obliko dimenzij $30 \text{ nm} \times 60 \text{ nm}$ (Skaleric in sod., 1979), dolžina kristalov pa še ni natančno ugotovljena; verjetno dosega 100 - 200 nm.

Tvorba sklenine (amelogeneza) je vezana na osnovno, visoko diferencirano celico ameloblast in njen Tomesov podaljšek, ki izloča organski matriks. Mineralizacija matriksa se začne skoraj sočasno, ko je izločen. Prvi vidni kristali so kot drobni lističi in precej tanjši od končnih kristalov. Med razvojem se kristali predvsem debelijo. Prizme in medprizemski del opazimo šele, ko je sklenina toliko mineralizirana, da različno usmerjeni kristali dajejo svetle in temne odtenke.

Sklenina se mineralizira postopno. Razlikujemo prvotno ali primarno mineralizacijo in dokončno ali sekundarno mineralizacijo sklenine (tudi zorenje ali maturacija sklenine). Prvotna mineralizacija se prične skoraj sočasno z izločanjem organskega matriksa; sklenina za njo doseže 20 – 30 vol. % mineralov. Popolnoma se mineralizira z zorenjem. Zori pred izraščanjem zoba v ustno votlino in še nekaj let pozneje (Avery, 1994).

1.2.2. Anorganska snov v sklenini

Zobna sklenina vsebuje 95 utež. % anorganskih snovi in je najbolj mineralizirano tkivo v človeškem organizmu. Osnovna mineralna komponenta sklenine je kalcijev hidroksiapatit – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Sklenina mlečnih zob vsebuje manj mineralov kot sklenina stalnih zob (Angmar in Manson, 1963). Količnik Ca/P sklenine je 1.92 – 2.10. Hidroksiapatit ima količnik Ca/P 2.15. Razlika nastane zaradi zamenjave Ca v kristalu sklenine z drugimi elementi: Mg, Ba, Fe, Se, Sr, Na, K. Zamenjavi sta podvržena tudi PO_4 (z AsO_4) in OH (s F, Cl, CO_3). Do zamenjav prihaja med razvojem zoba ali kasneje v ustni votlini. Zamenjave vplivajo na lastnosti kristala (Driessens, 1982).

1.2.3. Organska snov v sklenini

Količina organskih snovi v zreli sklenini znaša en utežni oziroma dva prostorninska odstotka (Brudevold in Söremark, 1967). Sklenina mlečnih zob vsebuje 15 % več organske substance kot sklenina stalnih zob (Stack in Williams, 1952, Stack, 1953). Površina spoja med organsko in anorgansko substanco je v mlečnih zobeh približno za 15 % večja kot v stalnih zobeh (Silness in sod., 1973).

Količina organske snovi narašča od površine sklenine proti skleninsko-dentinski meji (Jenkins, 1978). Sestavljajo jo predvsem beljakovine (Weatherel in sod., 1968) in lipidi (Odutuga in Prout, 1974), ostalo so ogljikovi hidrati (Burges in sod., 1960), citrat in laktat (Brudevold in sod., 1960). Pomembni sestavini sta hondroitin-4-fosfat ali hondroitin-6-fosfat (Nakata, 1982). Organske snovi verjetno obdajajo kristale v obliki brezstrukturnega gela (Angmar in Manson, 1971), ki ima tiksotropne lastnosti (Eastoe, 1963) ali pa obkroža apatitne mikrokristale kot dvojna vijajnica, vsaj med razvojem sklenine (Smales, 1975). Beljakovine in maščobe imajo verjetno pomembno vlogo pri kontroli difuzije v sklenini (Nyvad in sod., 1988) in delujejo kot difuzijska bariera med zgodnjim karioznim procesom (Robinson in sod., 1975).

Količina beljakovin v sklenini znaša od 0,2 do 0,3 utež. % (Jenkins, 1978) in narašča proti skleninsko-dentinski meji, kjer so tudi skleninski čopki (Robinson in sod., 1971). Pretežno sestavljajo beljakovine v sklenini naslednje aminokisliline: alanin, glicin, glutaminska kislina, prolin, asparaginska kislina, serin, leucin, triptofan, tirozin in fenilalanin (Glimcher in sod., 1964, Weidman in Eyre, 1967, Smillie, 1973). Beljakovine v sklenini se delijo na topne in netopne. Topne beljakovine, ki jih je precej manj, se nahajajo predvsem v površinski sklenini, netopnih pa je več ob skleninsko-dentinski meji. Topni in netopni del beljakovin se razlikujeta predvsem po aminokislinski sestavi (Weatherel in sod., 1968, Jenkins, 1978). Beljakovine v sklenini naj bi delovale zaščitno proti zobni gnilobi, saj naj bi bila količina beljakovin na mestu začetnega karioznega procesa in v zreli sklenini večja kot običajno (Biby, 1971, Robinson in sod., 1975, Nyvad in sod., 1988).

V sklenini stalnih zob je okrog 0,5 utež. % lipidov in jih je kar 26-krat več kot v dentinu glede na enoto organske snovi. V zreli sklenini je približno 60 - 70 % nevtralnih lipidov, ostalo so kisli fosfolipidi. Najmočnejše so zastopani holesterol, estri

holesterola, trigliceridi in lecitin. Glavne maščobne kisline v nevtralnih lipidih in kisljih fosfolipidih so palmitinska, stearinska, oleinska, palmitoleinska in linolinska (Prout in Odutuga, 1974). Lipidi, predvsem kisli fosfolipidi, igrajo pomembno vlogo v procesu mineralizacije ne le v sklenini, temveč v vseh mineraliziranih tkivih (Shapiro in sod., 1966, Vogel in Ennever, 1975, Udutuga in sod., 1975). Vlogo pri mineralizaciji naj bi imele tudi lipofilne beljakovine, bogate s prolinom, ali lipoproteinski kompleksi (Beynon, 1976, Patterson in sod., 1977). Količina lipidov naj bi z leti naraščala, vendar bi bile večje izmerjene količine lahko posledica ostankov bakterij, ki so jih našli v sklenini (Little in sod., 1962, Armstrong in Hayward, 1968).

1.2.4. Prepustnost sklenine

Začetni stadij karioznega procesa obsega razvoj demineraliziranega področja pod razmeroma intaktno plastjo površinske sklenine (Appelbaum, 1940, Bergman in Lind, 1966). Kariozni proces prizadane površinsko plast sklenine šele pozno v poteku bolezni, največkrat šele tik pred vdrtnjem le-te v izpodjedeno področje (Silverstone, 1967). Za razvoj kariozne lezije v sklenini je torej potreben transport kislin v in transport mineralnih gradnikov iz področja demineralizacije skozi povrhnjo intaktno skleninsko plast (Gray in sod., 1962, Holly in Gray, 1968, Silverstone, 1973, Moreno in Zahradnik, 1974, Higuchi, 1974). v dinamičnem procesu nastanka kariesa je torej pomembna velikost difuzije kariogenih in kariostatičnih substanc.

Mikrokristali v sklenini so večinoma s svojimi vzdolžnimi osmi orientirani vzporedno z vzdolžno osjo prizem (Frank in sod., 1960). Odstopanje od te osnovne smeri se opaža predvsem v interprizmatskem prostoru (Sharpe, 1967, Swancar in sod., 1970, Hamilton in sod., 1973, Scott in sod., 1974). Razlike v urejenosti mikrokristalov pogojujejo nastanek dveh vrst por v sklenini (Moreno in Zahradnik, 1973, Zahradnik in Moreno, 1975): večje so interprizmatsko, manjše pa intraprizmatsko. Pot, po kateri difundirajo delci v zobno sklenino, so pore interprizmatske substance (Fosdick, 1963, Linden, 1968, Keckaert, 1973) ali natančneje meje skleninskih prizem. Drugače rečeno, snovi potujejo po kanalih v sklenini, kjer je prisotna najmanjša stopnja kalcifikacije (Ronholm, 1962, Tabet in Fosdick, 1971, Dibdin, 1993). V interprizmatskem prostoru je urejenost mikrokristalov manjša (Hamilton in sod., 1973, Scott in sod., 1974), količina

organske substance pa večja kot v intraprizmatskem prostoru (Ronholm, 1962, Meckel in sod., 1965, Nyvad in sod., 1988).

Povprečni premer por, ki so jih izmerili v raziskavah številni avtorji, je 40 Å. Vzdolž por prihaja do zožitev, ki včasih ne presegajo molekularnih dimenzij (Rao, 1939, Rao, 1940, Moreno in Zahradnik, 1973). Notranja površina por, torej površina sklenine, ki je na voljo delcem, da z njo reagirajo, znaša od 0.3 m²/g (Dibdin, 1969) do 3.9 m²/g (Moreno in Zahradnik, 1973). Skleninske pore so prazni prostori ali pa so napolnjene s tekočino in amorfnim organskim gelom (Linden, 1968, Zahradnik in Moreno, 1975). Vloga organskih substanc v sklenini je enako pomembna kot v ostalih organskih sistemih (Borggreven in Driessens, 1986, Nyvad in sod., 1988). Sklenina mlečnih zob je bolj porozna kot sklenina stalnih zob (Mortimer, 1970, Skalerič, 1982).

Sklenina deluje kot polprepustna membrana z različno prepustnostjo za anione in katione, pore v membrani pa nosijo negativen naboj (Amberson in sod., 1926, Klein in Amberson, 1929, Chick in Waters, 1963), kar so potrdili tudi kasnejši poiskusi v čisti raztopini KCl in pri nevtralnem pH (Waters, 1971, Tung in Brown, 1983, Carey in sod., 1991). Negativni naboj por se lahko spremeni z adsorpcijo ionov (Waters, 1971, Waters, 1975). Ker so pore negativno nabite, molekule brez ali z malo naboja lažje prehajajo skozi zobno sklenino kot molekule ali delci s pozitivnim nabojem (Skalerič in sod., 1983).

Za anione, kot je F⁻, je proces difuzije oviran ne le zaradi naboja, temveč tudi zaradi interakcije le-teh s kristali CaHA. Molekula akriflavina, ki je večja od fluoridnega iona, in pozitivno nabita, je kljub svojemu naboju prehajala skozi sklenino mnogo hitreje (Tarbet in Fosdick, 1971, Grön, 1971). Natrij je kation s podobnim ionskim premerom kot fluor, vendar za razliko od njega ne reagira s kristali in kljub pozitivnemu naboju prehaja skozi sklenino mnogo hitreje (Braden in sod., 1971). Tudi klorheksidin, močna baza s kationskim značajem, kaže afiniteto do hidroksiapatita (Arends in sod., 1966, Röla, 1977). Skozi sklenino prehaja sicer hitreje kot F⁻, vendar počasneje kot molekule brez naboja (Linden in sod., 1986).

Difuzija molekul brez ali z malo naboja, torej tistih, ki do hidroksiapatita na splošno nimajo afinitete, je odvisna predvsem od njihove velikosti: večje prehajajo počasneje, manjše hitreje (Volf in sod., 1971). Sklenina se v tem primeru obnaša kot sito z določeno velikostjo por (Darling in sod., 1961, Poole in Stack, 1965).

Transportni procesi v sklenini, ki temeljijo na difuziji, so močno odvisni od količine proste vode v sklenini. Pri merjenju količine vode v sklenini so raziskovalci uporabljali različne tehnike. Določali so jo s spremembo teže skleninskih vzorcev med sušenjem in izmerili 2 - 4 utež. % vode (Burnett in Zenewitz, 1958, Moreno in sod., 1962, Carlström in sod., 1963). Merili so količino privzetih vodnih par v posušeni sklenini (Poole in Stack, 1965), sklenino so obsevali s polarizirano svetlobo (Gwinnet, 1975), uporabljali so termogravimetrične analize (Little in Casciani, 1977) in jedrsko magnetno resonanco (Myers, 1965, Dibdin in Casciani, 1971). Količina vode v sklenini mlečnih in stalnih zob, merjena z različnimi tehnikami, je po podatkih iz literature od 1 do 6 utež. %. Različne izmerjene vrednosti so posledica uporabe različnih metod in materiala. Sklenina mlečnih zob vsebuje več vode kot sklenina stalnih zob (Bird in sod., 1940).

Približno ena četrtnina vode je prosta voda oziroma vezana na organsko snov v sklenini, tri četrtine vode pa je v obliki hidracijskega ovoja, ki je čvrsto vezan na kristale (Brudevold in Söremark, 1967). Vsebina proste vode v sklenini je odvisna od relativne vlage okolice (Dibdin, 1972).

Transportni medij za molekule in ione, ki difundirajo skozi sklenino, je prosta voda. Površinska plast sklenine vsebuje najmanj proste vode, količina le-te pa narašča proti skleninsko-dentinski meji (Brudevold in sod., 1960). Tako površinske plasti sklenine zob, ki so popolno formirani in izrasli, privzemajo manjše količine radioaktivnega fluora in natrija kot skleninske plasti, ki so bliže skleninsko-dentinski površini. Obratno velja za sklenino zob, ki so še neizrasli in nepopolno formirani, saj je v tem primeru površinska plast sklenine zaradi še nodokončane mineralizacije manj mineralizirana in ima tako več vode in organske substance. Nasprotno od pričakovanj pa sklenina popolnoma izraslih zob ne kaže razlik v količini privzemanja radioaktivnega joda v različnih skleninskih plasteh (Hardwick in Fremlin, 1959, Joston – Bechal in sod., 1971). Količina proste vode v sklenini je manjša v zobeh starejših ljudi (Moreno in Zahradnik, 1973) in v trdih tkivih nekarioznih zob v primerjavi s količino proste vode v zdravi sklenini karioznih zob (Cromwell in sod., 1964). Razlikuje se tudi pri različnih zobeh (Moreno in Zahradnik, 1973).

Po segrevanju sklenine do 80°C so ugotovili, da je popolna rehidracija sklenine še možna, po segrevanju sklenine nad 110°C se je sposobnost rehidracije zmanjšala (Carlstrom in sod., 1963). Zunanja plast sklenine (brezprizmatska sklenina)

in sklenina na skleninsko-dentinski meji pa kažeta sposobnost popolne rehidracije še po segrevanju nad 110°C (Carlstrom in sod., 1963).

Sklenina je tkivo, ki doživlja spremembe pred in tudi po tem, ko je zob že izrasel, saj je stalno izpostavljena okolju ustne votline. Pojavnost kariesa je večja pri mladostnikih in se zmanjšuje pri starejših ljudeh, kar je povezano s stopnjo zrelosti sklenine, torej stanjem, ko sklenina razvije svojo zrelo, bolj odporno obliko (Bodecker, 1960). Poiskusi so pokazali, da je prepustnost sklenine obratno sorazmerna času izpostavljenosti zoba okolju ustne votline (Atkinson, 1947). Spremembe so ultrastrukturne in kemične (Arends in sod., 1978) in so med drugim tudi posledica fizikalno-kemičnih mehanizmov: difuzije, osmoze, izmenjave ionov ter spremembe organske substance, torej mehanizmov, ki so ozko povezani s prevodnostjo tkiv. Dokazali so, da je sklenina neizraslih zob bolj prepustna kot sklenina izraslih zob (Silverstone in Johnson, 1971). Komaj izrasli stalni zobje privzemajo F^- hitreje in v večjih količinah (Melberg in Nicholson, 1968, Nicholson in Melberg, 1969, Bruun, 1988), kažejo večjo sposobnost reabsorpcije vode (Zahradnik in Moreno, 1975) in privzemajo večje količine joda (Brudevold in sod., 1982) kot sklenina starejših stalnih zob.

Pri študiji na umetni kariozni leziji so ugotovili, da je difuzija barvila skozi sklenino mlečnih zob 1,5-krat večja kot skozi sklenino stalnih zob (Featherstone in Melberg, 1981), F^- in C^{14} -klorheksidin pa sta skozi mlečno sklenino prehajala kar tridesetkrat hitreje kot skozi sklenino stalnih zob (Linden in sod., 1986). Difuzijski koeficienti za vodotopne spinske označevalce so dvakrat večji v sklenini mlečnih zob v primerjavi s sklenino stalnih zob (Skaleric, 1975). Prepustnost sklenine mlečnih zob se zmanjša med procesom resorpcije korenine (Atkinson in Mathews, 1949).

Večina študij difuzije skozi zobno sklenino je potekala *in vitro*. Prepustnost so preučevali z ioni (Chick in Waters, 1963, Tarbet in Fosdick, 1964), barvili, toksini (Spektorova in Borisova, 1967), biološko aktivnimi substancami (Borggreven in Driessens, 1986), radiaktivnimi izotopi (Hardwick, 1961, Leus, 1969, Ravnik, 1969, Braden in sod., 1971, Jojstone-Bechal in sod., 1971).

Prepustnost sklenine so v *in vivo* pogojih raziskovali razmeroma malo. Pri poiskusih na živih psih, ki so bili anestezirani, so dokazali, da metilensko modrilo vstopa v pasjo sklenino (Fish, 1931). Barlestone je leta 1951 apliciral J^{131} na mačje zobe. Po določenem času je našel izotop v ščitnici živali. S tem je dokazal, da je

izotop prehajal skozi zobno sklenino in nato po krvi prišel v ščitnico. Pri študiji difuzijskih procesov na pasjih zobeh so ugotovili večjo prepustnost sklenine v živih pasjih zobeh v primerjavi s prepustnostjo sklenine zob, ki so bili izruvani, in zaključili, da se fizikalne lastnosti zobne sklenine močno spremenijo po izruvanju (Jansen in Visser, 1950).

Zelo malo je znanega o prepustnosti človeške sklenine v *in vivo* pogojih. Do sedaj so dokazali, da je sklenina človeških zob prepustna za akriflavin in NaF. Hitrostjo difuzije v *in vivo* pogojih je bila desekrat hitrejša kot v *in vitro* pogojih (Tarbet in Fosdick, 1964, Tarbet in Fosdick, 1971).

1.2.5. Difuzijski koeficient

Primeren parameter, ki opisuje prodiranje ionov ali molekul v sklenino, je difuzijski koeficient (D izražen v cm^2/s), ki so ga predlagali mnogi raziskovalci (Braden in sod., 1971, Moreno in Burke, 1974). Sila, ki potiska ione in molekule skozi sklenino, je gradient elektrokemičnega potenciala (μ_0). Elektrokemični potencial je vsota kemičnega (μ) in električnega (E) potenciala.

$$\mu_0 = \mu_i + z_i F E$$

Index i predstavlja komponento, ki difundira v sklenino, z_i pa njen naboj. F je Faradejeva konstanta. Kemični potencial lahko predstavimo kot aktivnost (a_i) komponente.

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln a_i$$

R = plinska konstanta

T = temperatura

μ_i^0 = konstanta

Sila, ki ustvari enosmerno difuzijo, se lahko tako zapiše kot:

$$\chi_i = RT \frac{d \ln a_i}{dx} + z_i F \frac{dE}{dx}$$

Velikost difuzije, torej pretok, je sorazmeren tej sili (χ_i) in koncentraciji komponente (c_i):

$$J_i = - c_i RT d \ln a_i / k_i dx - c_i z_i F dE / k_i dx$$

Če izraz RT/k_i zamenjamo z difuzijskim koeficientom D_i (Einsteinova relacija), dobimo Nernst - Planckovo enačbo za pretok:

$$J_i = - D_i c_i \left\{ d \ln a_i / dx + z_i F dE / RT dx \right\}$$

Pri neskončni razredčenosti vzorca aktivnost a_i postane enaka koncentraciji c_i in če se i nanaša na molekulo ($z_i = 0$), se enačba okrajša na:

$$J_i = - D_i \left\{ dc_i / dx \right\}$$

To je Fickov prvi zakon, ki definira difuzijski koeficient, ki ga uporabljamo pri študijah prehajanja delcev skozi sklenino.

V nestalnih pogojih pretok ionov ali molekul povzroči spremembo koncentracije le-teh. Če upoštevamo zakon o ohranitvi mase, lahko zgoraj navedeni izraz spremenimo v:

$$dc_i/dt = - dJ_i / dx$$

Pri neskončni razredčenosti in ničelnem naboju se izraz transformira v Fickov drugi zakon, ki definira difuzijski koeficient, ki se uporablja pri raziskavah, kjer delci prodirajo v sklenino. To definicijo smo uporabili tudi v naši raziskavi.

$$dc_i/dt = D_i d^2 c_i / dx^2$$

Če kos sklenine damo v raztopino, ki vsebuje komponento i , koncentracije c_{i1} in se njena začetna koncentracija v sklenini ne spreminja, je koncentracija komponente na globini x po času t :

$$c_i(x,t) = c_{i1} [1 - \operatorname{erf}(x/2\sqrt{Dt})]$$

Koncentracija na globini x v sklenini se poveča za 50 % po času $t_{1/2}$:

$$t_{1/2} = x^2/D$$

Če je enota za D cm^2/s in če je x v cm , potem je enota za $t_{1/2}$ sekunda (s).

2. NAMEN NALOGE

Namen našega dela je bil ugotoviti razlike v stopnji prepustnosti sklenine mlečnih zob z resorbiranimi in mlečnih zob z neresorbiranimi koreninami.

Zanimala nas je tudi razlika v prepustnosti sklenine stalnih zob z živo in stalnih zob z odstranjeno zobno pulpo.

Za merjenje prepustnosti smo uporabili metodo elektronske paramagnetne resonance, ki smo jo podprli z merjenjem količine vode v sklenini, ki predstavlja medij za difuzijske procese.

3. MATERIALI IN METODE

Delo je potekalo v Laboratoriju za biofiziko Odseka za fiziko trde snovi Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani.

3.1. METODE DELA

Prepustnost sklenine smo ovrednotili z difuzijskimi koeficienti (D). Določili smo jih z metodo elektronske paramagnetne resonance (EPR), ki je spektroskopska metoda, s katero preučujemo paramagnetne centre v vzorcu, njihovo neposredno okolico in dogajanje v njej. Paramagnetni centri ali prosti radikali so atomi, ioni in molekule, ki imajo v svoji strukturi enega ali več neparnih elektronov in imajo zaradi tega magnetni dipolni moment:

$$\mu = -\beta \times g \times S.$$

Če damo paramagnetno snov v magnetno polje, pride do interakcije med magnetnim momentom elektrona in magnetnim poljem. Energija takšne interakcije je:

$$E = -\mu \times H.$$

Elektroni, ki so imeli izven magnetnega polja vsi enako energijo, se v magnetnem polju razdelijo v več skupin, ki se ločijo po energiji. Pravimo, da se energijski nivo elektronov razcepi na več nivojev. Energijska razlika med nivoji je:

$$\Delta E = \beta \times \mu_0 \times g \times H, \text{ pri čemer je:}$$

H = jakost magnetnega polja,

β = Bohrov magneton,

$\mu_0 = 4 \pi \times 10^{-7} \text{ Vs/Am}$,

g = spektroskopski cepitveni tenzor, ki opisuje interakcije med magnetnim momentom in magnetnim poljem in je značilen za dano paramagnetno snov.

Če torej na sistem s paramagnetnimi centri delujemo z elektromagnetnim valovanjem primerne energije ($h \times \nu$), kjer je h Planckova konstanta ($h = 6,6294 \times 10^{-34}$ Js), ν pa frekvenca mikrovalov, prehajajo elektroni iz enega energijskega nivoja v drugega, ko je izpolnjen resonančni pogoj:

$$\Delta E = h \times \nu = \beta \times \mu_0 \times g \times H.$$

Pri tem se elektromagnetno valovanje absorbira, kar zaznamo kot EPR spekter. Intenziteta spektra nam posreduje podatke o koncentraciji paramagnetnih centrov v snovi, iz oblike spektrov pa lahko dobimo podatke o strukturi in dinamiki okolice paramagnetnih centrov.

Paramagnetni centri, v kemiji jim pravimo prosti radikali, nastajajo pri kemijskih reakcijah, pri delovanju elektromagnetnega valovanja ustrezne frekvence na snov, pri visokih temperaturah in povsod, kjer pride do trganja kemijskih vezi.

Paramagnetni centri bioloških sistemov so prosti radikali, ki se pojavljajo kot vmesni produkti pri celični presnovi, in ioni prehodnih elementov, ki so običajno koencimi. Ti paramagnetni centri omogočajo, da z metodo EPR opazujemo biokemične procese v živih organizmih ter njihove spremembe, nastale zaradi bolezni.

Biološki material pa lahko zaznamujemo tudi z določenimi paramagnetnimi spojinami, ki jih imenujemo spinski označevalci. Ti služijo kot sonda za opazovanje strukture v svoji okolici. S spinskimi označevalci lahko preučujejo vpliv zdravilnih učinkovin ter drugih fizikalno kemičnih dejavnikov na strukturo okolice spinskega označevalca in prav tako tudi spremembe, ki v tej strukturi nastajajo zaradi patoloških procesov.

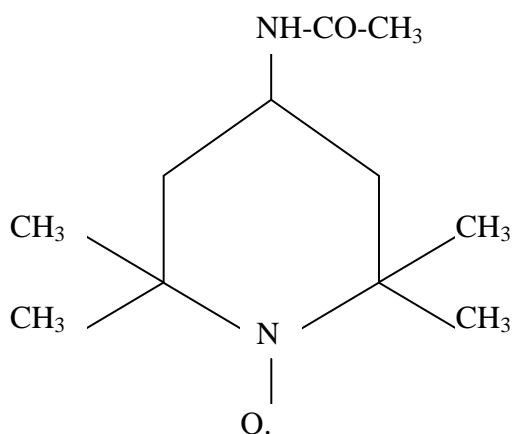
Slikanje z EPR ima široko uporabnost v biomedicinskih raziskavah. V primerjavi z drugimi tehnikami, ki tudi omogočajo prostorsko ločljivost merjenega vzorca, npr. jedrska magnetna resonanca (NMR) ali ultrazvok, ima slikanje z EPR pomembne prednosti: visoka prostorska ločljivost in možnost spremljanja specifičnih biokemijskih in biofizikalnih procesov. EPR metoda je neinvazivna, razen v trenutku vstavljanja spinskega označevalca v tkivo. Metoda je občutljiva, meritve pa se lahko ponavljajo v intervalih, ki so krajši od ene minute (Swartz, 1991). Glavna težava pri uporabi EPR (x-trak) pri preučevanju bioloških vzorcev je visoka dielektrična

absorpcija, ki je posledica visoke koncentracije vode in ionov v takih vzorcih. Zato so možne le meritve na tankih vzorcih, debeline ne več kot 1 mm.

Prosti radikali, ki so bili uporabljeni pri raziskavah trdih zobnih tkiv, so bile molekule, kot je CO_3^{3-} (Skaleric, 1997), pridobljen z obsevanjem sklenine z visokoenergijskimi žarki in prehodni ionski kompleksi kovin Mn^+ in Cu^{2+} (Weil in sod., 1994). Običajno so prosti radikali silno neobstojni. Velik napredek je bil dosežen z uporabo dušikovih oksidov, ki so semistabilni prosti radikali in dajejo EPR signal. Uporabljamo jih pri metodi spinskega označevanja, kakršno smo uporabili tudi mi.

3.2. ZASNOVA EKSPERIMENTA

V nalogi smo ovrednotili razliko v prepustnosti sklenine in količini proste vode v sklenini med skupinami zob (skleninskih vzorcev). V vsakem vzorcu sklenine smo določili difuzijski koeficient (D) za vodotopni spinski označevalec 2,2,6,6-tetrametil-4-acetamido-piperidin-oksil (TMAPO) (Slika 1), zatem pa smo v istih vzorcih izmerili količino proste vode (W). Difuzijske koeficiente smo določili z metodo elektronske paramagnetne resonance (EPR), ki skupaj z uporabo za to nalogo izdelanih matematičnih modelov omogoča določitev koncentracije paramagnetne snovi (vodotopnega spinskega označevalca), ki je v določenem času vstopila v skleninske vzorce. Količino vode smo določili z merjenjem izgube teže vzorcev med sušenjem na sobni temperaturi. Izračunali smo povprečne difuzijske koeficiente in povprečno količino vode v posameznih skupinah vzorcev in jih primerjali med seboj.



Slika 1: Shematski prikaz molekule TMAPO.

3.3. MATERIALI IN PRIPRAVA VZORCEV SKLENINE

Zobje so bili izruvani bolnikom, ki so bili napoteni na Kliniko za oralno in maksilofacialno kirurgijo. Izruvani so bili zaradi močne majavosti, ortodontskih indikacij, protetičnih indikacij, radioterapije, poškodbe in kariesa. Paciente smo zaprosili, naj zobe prostovoljno darujejo za namene raziskave. Pri otrocih in mladoletnih osebah smo z našim namenom seznanili tudi njihove starše.

Takoj po izruvanju smo z zob odstranili ves organski material, nato pa izrezali vzorce sklenine iz bukalne ploskve enokoreninskih zgornjih in spodnjih zob, približno 1-2 mm nad skleninsko-dentinsko mejo. Ploščice smo izrezali z vodno hlajeno turbinsko vrtalko (Jugodent), z diamantnim svedrom (Super Torque 630 B; Kavo) pri 300000 vrtljajih v minuti. Debelino vzorca je določala debelina zobne sklenine, ki je v povprečju znašala 0,9 mm (SD = 0,1 mm). Povprečna površina vzorcev je bila 12,1 mm² (SD = 2,3 mm²). Sklenino smo pregledali s svetlobnim mikroskopom (Nikon profile projektor V-12 A; Nipon Kogaku, Japan) pod petnajstkratno povečavo in izločili iz poiskusa vse, ki so imeli razpoke, temne ali bele lise. Vzorce sklenine smo hranili v fiziološki raztopini v hladilniku pri temperaturi 4 – 6 °C. Prepustnost posameznih vzorcev smo pomerili v roku dvajsetih ur po izruvanju zoba.

Zobe, iz katerih smo pripravili vzorce, smo razdelili v štiri skupine:

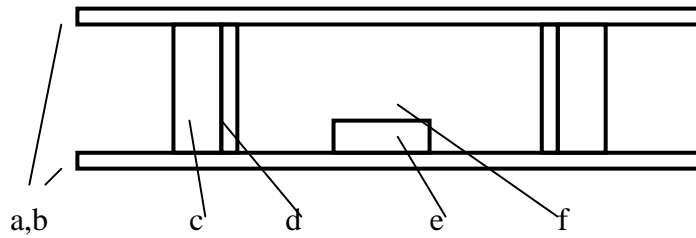
- A.** skupina mlečnih zob s koreninami, resorbiranimi največ do polovice (povprečna starost bolnikov: 6,7 let, SD: 1,5 let, n: 12)
- B.** skupina mlečnih zob s popolnoma resorbiranimi koreninami (povprečna starost bolnikov: 9,1 leto, SD: 1,2 leti, n: 11)
- C.** skupina stalnih zob, ki so bili izruvani mlajšim bolnikom (povprečna starost bolnikov: 24,1 leto, SD: 7,1 leto, n: 15)
- D.** skupina stalnih zob, ki so bili devitalizirani 2 do 5 let (povprečna starost bolnikov: 27,3 leta, SD: 5,7 let, n: 12)
- E.** skupina stalnih zob, ki so bili izruvani starejšim bolnikom (povprečna starost bolnikov: 49,1 leto, SD: 8,2 leti, n: 15)

3.4. MERJENJE PREPUSTNOSTI SKLENINE

Mokre vzorce smo namestili v komoro s stalno 100 % vlažnostjo, ki jo je zagotavljal s fiziološko raztopino navlažen filtrirni papir. Komora je bila sestavljena iz dveh steklenih ploščic, ločenih z gumijastim obročkom (Slika 2). Med steklo in obročke smo nanесли silikonsko mast (Kemika, Zagreb, Hrvaška), ki je dodatno zatesnila prostor znotraj komore. Približno 5 μ l 0,01 molarne spinskega označevalca 2,2,6,6-tetrametil-4-acetamido-piperidin-oksil (TMAPO) v vodni raztopini smo kanili na površino sklenine. TMAPO je šibko negativno nabita paramagnetna molekula z molekulsko maso 226.

Vzorce sklenine smo inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi. Med časom inkubacije smo preverjali, če je kapljica označevalca le na površini sklenine, čez rob razlita pa smo zavrgli. Po inkubaciji smo vzorce vzeli iz komore in odpihnili s površine vzorca preostanek spinskega označevalca, ki v tem času ni proniknil v sklenino. Nato smo posneli EPR spekter. Med meritvijo smo vzorce zatesnili v steklene, za to prirejene komore, z laboratorijskim filmom, ki ne povzroča motenj na EPR spektru (Parafilm M; Greenwich, CT). Spektre smo posneli na spektrometru tipa Bruker. Spektri so bili posneti v 3 minutah, pri časovni konstanti 0,3 s, pri območju skeniranja 100 G (Gaus) in pri sredinskem magnetnem polju 3400 G. Vsi spektri so bili računalniško obdelani.

Difuzijske koeficiente smo dobili s primerjanjem izmerjenih in izračunanih spektrov. V ta namen je bil izdelan matematični model, ki sloni na analizi efektivnosti spinske izmenjave in podaja možne koncentracijske profile ob danem času po inkubaciji. S tem določa hitrost difuzije oziroma prepustnost zobne sklenine za prehajanje spinskih označevalcev in njim podobnih molekul. Model omogoča določitev difuzijskega koeficienta za spinski označevalec brez snemanja EPR spektrov z gradientom magnetnega polja, kar je bilo do sedaj potrebno. Debelina, površina in oblika vzorca so bili upoštevani pri izračunu.



Slika 2: Shema komore. Komora s konstantno 100% vlažnostjo v kateri je vzorec: a, b steklene ploščice; c, gumijasti obroček; d, filter papir; e, vzorec; f, kapljica spinskega označevalca (TMAPO).

3.4.1. Matematični model

Difuzija v eni dimenziji:

$$\delta c / \delta t = D \delta^2 c / \delta x^2 + \text{zač. pogoj } c(x)_{t=0} = f(x)$$

1. Z uvedbo $c(x,t) = \lambda(x) T(t) \rightarrow T'/DT = x^4/x = -\lambda^2 \rightarrow T(t) = C_\lambda e^{-\lambda \times \lambda Dt}$

2. Razvijemo po lastnih funkcijah T(t)

$$c(x,t) = \int_0^\infty c(\lambda) e^{-\lambda \times \lambda Dt} \cos \lambda \, d\lambda$$

↳ iz robnega pogoja $X'(0=0)$ kot $\cos \lambda x$
(ker na robu nikamor ne odteka snov \rightarrow ni gradienta)

$$f(x) = \int_0^\infty c(\lambda) \cos \lambda x \, d\lambda \rightarrow c(\lambda) = 2/\pi \int_0^\infty f(x_1) \cos \lambda x_1 \, dx_1$$

$$\begin{aligned}
c(x,t) &= 2/\pi \int_0^\infty f(x_1) \int_0^\infty C^{-\lambda \times \lambda Dt} \cos \lambda x_1 \cos \lambda x \, d\lambda \, dx_1 \\
&= 1/\pi \int_0^\infty f(x_1) \int_0^\infty e^{-\lambda \times \lambda Dt} \cos (\lambda(x_1-x)) + \cos (\lambda(x_1+x)) \, d\lambda \, dx_1 \\
&= 1/\sqrt{4\pi Dt} \int_0^\infty f(x_1) [e^{-(x_1-x) \times (x_1-x)/4Dt} + e^{-(x_1+x) \times (x_1+x)/4Dt}] \, dx_1
\end{aligned}$$

naj bo: $f(x < a) = c_0$

$f(x > a) = 0$ ob $t = 0$

$$u = x_1 - x / \sqrt{4Dt}$$

$$du = dx_1 / \sqrt{4Dt} = a / \sqrt{4Dt} \, dx_1 / a$$

$$c(x,t;D) = c_0 / \sqrt{\pi} \left[\int_{-x/\sqrt{4Dt}}^{a-x/\sqrt{4Dt}} e^{-u^2} \, du + \int_{x/\sqrt{4Dt}}^{a+x/\sqrt{4Dt}} e^{-u^2} \, du \right]$$

Obdelava spektra:

Iz spektra dobimo tri domene:

W_1, W_2, W_3 in d_1, d_2, d_3

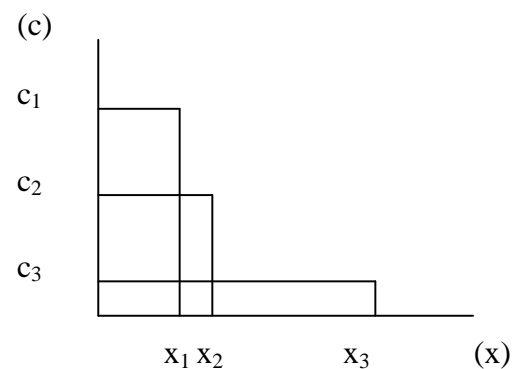
ker je W_1 preprostorazmeren $D \times c$ in

$$d_1(t') = A \int_0^{x_1} c(x,t') \, dx$$

$$d_2(t') = A \int_{x_1}^{x_2} c(x,t') \, dx$$

$$d_3(t') = A \int_{x_2}^\infty c(x,t) \, dx = c_0 \times a \times A - d_2(t') - d_1(t')$$

in



W_1 premosorazmeren $D d_1 / x_1$

W_2 premosorazmeren $D d_2 / x_2 - x_1$

W_3 premosorazmeren $D d_3 / \infty = 0$

torej so pomembni:

1. $d_1 = 1/c_0 a \int_0^{x_1} c(x, t') dx = \text{izmerjen } d_1 \text{ (kot delež)}$

2. $d_2 = 1/c_0 a \int_{x_1}^{x_2} c(x, t') dx = \text{izmerjen } d_2 \text{ (kot delež)}$

$$W_1 / W_2 = (d_2 \times x_1) / d_1 \times (x_2 - x_1) \rightarrow W_2 d_1 / W_1 d_2 = ((x_2 / x_1) - 1)^{-1}$$

$$\rightarrow x_2 / x_1 = 1 + (W_1 d_2 / W_2 d_1)$$

3. če naprimer izberemo $x_1 = a \rightarrow$

$$v = x/a$$

$$\pi = \sqrt{4Dt} / a^2$$

$$d_1 = 1/c_0 a \int_0^a \left[\int_{-x/\sqrt{4Dt}}^{(a-x)/\sqrt{4Dt}} e^{-u^2} du + \int_{x/\sqrt{4Dt}}^{(a+x)/\sqrt{4Dt}} e^{-u^2} du \right] dx/a$$

$$d_1 = 1/\sqrt{\pi} \int_0^1 \left[\int_{-v/\pi}^{(1-v)/\pi} e^{-u^2} du + \int_{v/\pi}^{(1+v)/\pi} e^{-u^2} du \right] dv$$

$d_1 = \text{enačba za } D$

$$d_2 = 1/\sqrt{\pi} \int_1^{1 + (W_1 d_2 / W_2 d_1)} \left[\int_{-v/\pi D'}^{1-v/\pi D'} e^{-u^2} du + \int_{v/\pi D'}^{(1+v)/\pi D'} e^{-u^2} du \right] dv$$

$d_2 = \text{enačba za } D' [\text{mm}^2/\text{min}] = [\text{cm}^2/\text{sek} \times 10^{-4}]$

3.5. DOLOČITEV KOLIČINE VODE V VZORCIH

Določili smo težo vsem skleninskim vzorcem takoj zatem, ko smo jih vzeli iz fiziološke raztopine, kjer so bili shranjeni. Vzorce smo sušili na zraku pri sobni temperaturi in pri 70 % relativni vlažnosti. Težo smo jim ponovno določil po treh, petih, desetih, dvajsetih, tridesetih, štiridesetih, petdesetih in šestdesetih minutah sušenja.

Težo smo določil tudi desetim vzorcem sklenine, ki smo jih sušili v komori pri 105°C in 20 % relativni vlažnosti. Vzorcem smo določili težo po dvajsetih, štiridesetih in šestdesetih minutah.

3.6. STATISTIČNA OBDELAVA

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili t-test. Z uporabo metode regresije smo analizirali spreminjanje prepustnosti in količine proste vode v sklenini v odvisnosti od starosti pacientov, z metodo korelacije pa spreminjanje prepustnosti v odvisnosti od količine proste vode.

4. REZULTATI

4.1. DOLOČITEV DIFUZIJSKIH KOEFICIENTOV V SKLENINSKIH VZORCIH

Z metodo EPR smo ugotavljali hitrost prodiranja vodotopnega spinskega označevalca TMAPO v vzorce sklenine. Intenziteta in oblika EPR spektra je odvisna od debeline vzorca, časa, v katerem spinski označevalec prodira v vzorec, gradienta magnetnega polja in od hitrosti difuzije, s katero molekule spinskega označevalca prodirajo v vzorec. Difuzijske koeficiente smo določili s primerjanjem izmerjenih (posnetih) in izračunanih EPR spektrov. Izračunani difuzijski koeficienti so rezultat najboljšega prileganja izračunanega spektra izmerjenemu (Slike 3 - 7).

Slika 3: Primer najboljšega prileganja izmerjenega in izračunanega spektra za vzorce iz skupine mlečnih zob z resorbiranimi koreninami največ do polovice.

Slika 4: Primer najboljšega prileganja izmerjenega in izračunanega spektra za vzorce iz skupine mlečnih zob s popolnoma resorbiranimi koreninami.

Slika 5: Primer najboljšega prileganja izmerjenega in izračunanega spektra za vzorce iz skupine stalnih zob mlajših bolnikov.

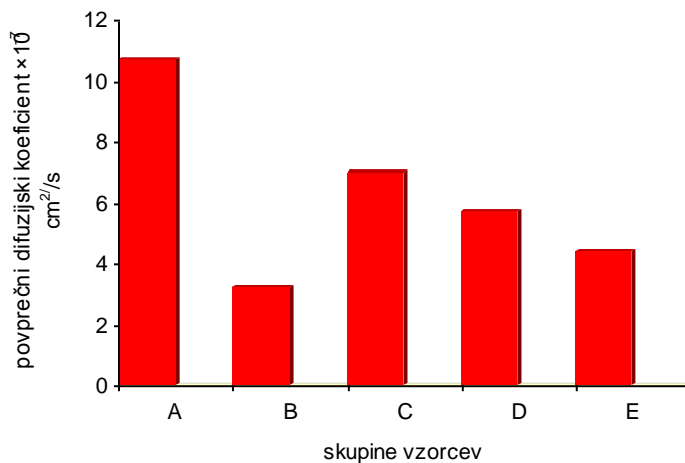
Slika 6: Primer najboljšega prileganja izmerjenega in izračunanega spektra za vzorce iz skupine stalnih devitaliziranih zob.

Slika 7: Primer najboljšega prileganja izmerjenega in izračunanega spektra za vzorce iz skupine stalnih zob starejših bolnikov.

Povprečni difuzijski koeficienti v posameznih skupinah vzorcev so bili v skupini A $10,72 \pm 2,83 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, v skupini B $3,22 \pm 0,66 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, v skupini C $7,03 \pm 0,61 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, v skupini D $5,75 \pm 0,28 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ in v skupini E $4,45 \pm 0,37 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ (Tabela 1). Največji povprečni difuzijski koeficient smo izmerili v skupini mlečnih zob z delno resorbiranimi koreninami (A), najmanjšega pa v skupini mlečnih zob s popolnoma resorbiranimi koreninami (B) ($p < 0,01$). Vrednosti povprečnih difuzijskih koeficientov izmerjene v skleninskih vzorcih stalnih zob so bile med obema skrajnima in so si sledile po velikosti od največje do najmanjše: skupina stalnih zob mlajših bolnikov (C), skupina zob z odstranjeno zobno pulpo (D) in skupina stalnih zob starejših pacientov (E) (Grafikon 1).

skupina	A	B	C	D	E
1	10	2,9	6,1	5,7	4
2	12	2,6	6,1	5,9	4,6
3	14	2,4	6,3	5,9	4,1
4	10	2,1	6,5	5,9	4,2
5	16	3,9	6,7	6,1	4,2
6	15	3,8	7,8	6,1	4,6
7	9,4	3,9	6,9	5,4	4,3
8	9,1	3,2	7,8	5,8	4,1
9	8,8	3,3	7,8	5,7	4,4
10	8,3	3,7	7,8	5,7	4,6
11	8	3,7	7,1	5,7	4,4
12	8		7,5	5,1	4,1
13			7,1		5
14			7,1		5,1
15			6,9		5,1
SD	2,83	0,66	0,61	0,28	0,37
x	10,72	3,22	7,03	5,75	4,45

Tabela 1: Izmerjeni difuzijski koeficienti (srednja vrednost \pm SD) D ($10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$). Številke v levem stolpcu so zaporedne številke vzorcev.



Grafikon 1: Povprečni difuzijski koeficienti v posameznih skupinah vzorcev.

Vrednosti difuzijskih koeficientov, ki smo jih izmerili v skleninskih vzorcih stalnih vitalnih zob, so odvisni od starosti bolnikov ($p < 0,05$) (Diagram 1).

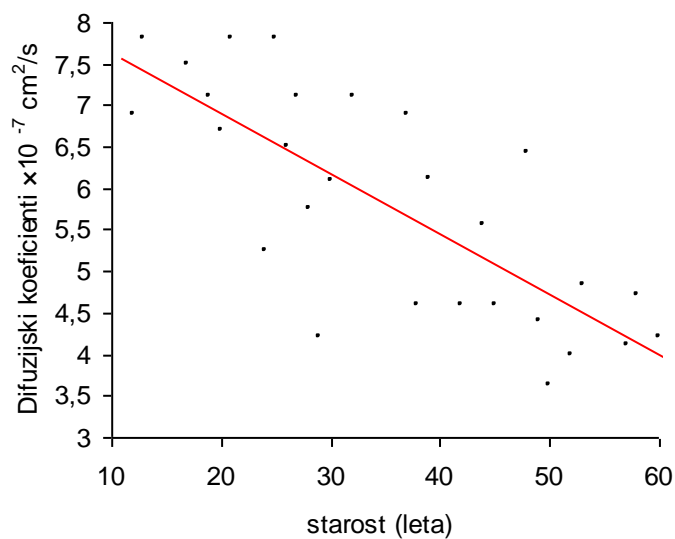


Diagram 1: Difuzijski koeficienti, izmerjeni v skleninskih vzorcih stalnih vitalnih zob, v odvisnosti od starosti bolnikov.

4.2. DOLOČITEV KOLIČINE PROSTE VODE V VZORCIH SKLENINE

Pri sušenju vseh skleninskih vzorcev na sobni temperaturi smo po eni uri ugotovili približno 4 % povprečno zmanjšanje teže vzorcev (Diagram 2). Po podaljšanem času sušenja se teža vzorcev ni več bistveno spreminjala. Pri sušenju dvajsetih skleninskih vzorcev pri 105°C in 20 % relativni vlažnosti smo izmerili približno enako zmanjšanje teže vzorcev kot pri sušenju na sobni temperaturi.

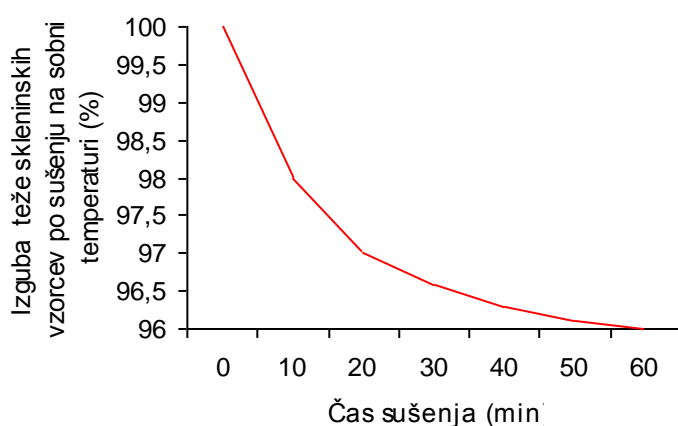


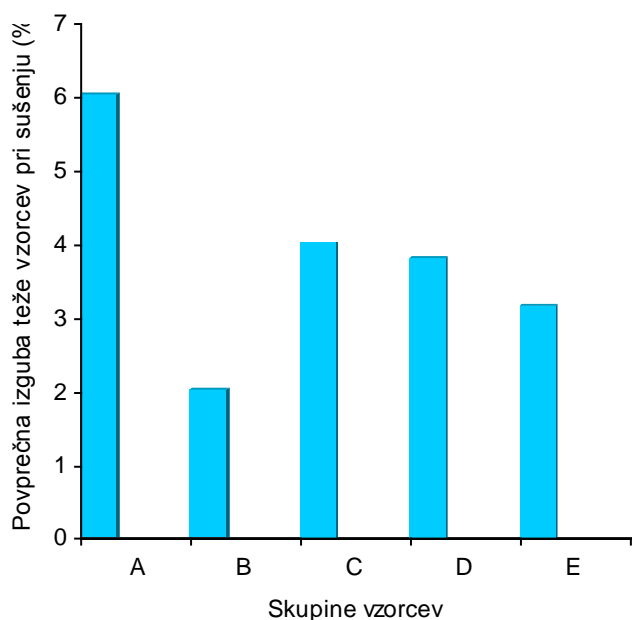
Diagram 2: Izguba teže skleninskih vzorcev pri sušenju na sobni temperaturi eno uro.

Povprečna izguba teže skleninskih vzorcev pri sušenju na sobni temperaturi eno uro je bila v skupini A $6,03 \pm 0,62$ %, v skupini B $2,04 \pm 0,16$ %, v skupini C $4,02 \pm 0,7$ %, v skupini D $3,82 \pm 0,67$ % in v skupini E $3,16 \pm 0,71$ % (Tabela 2).

skupina	A	B	C	D	E
teža pred sušenjem (g)	0.0905	0.1036	0.1332	0.1165	0.1227
teža po sušenju (g)	0.0851	0.1013	0.1279	0.1119	0.1226
delež izgubljene teže (%)	6.0275	2.0373	4.0156	3.8233	3.1559
SD	0.6161	0.1622	0.6995	0.6719	0.7066

Tabela 2: Povprečne teže skleninskih vzorcev pred in po sušenju na sobni temperaturi eno uro.

Največji utežni delež vode smo izmerili v skupini mlečnih zob, najmanjšega pa v skupini mlečnih zob z resorbiranimi koreninami ($p < 0,01$). Vrednosti izmerjenih deležev vode v sklenini stalnih zob so bili med obema skrajnima, po vrsti od največjega proti najmanjšemu pa so si skupine vzorcev sledile: skupina stalnih zob mlajših pacientov, skupina stalnih zob z odstranjeno zobno pulpo in skupina stalnih zob starejših pacientov (Grafikon 2).



Grafikon 2: Delež vode v posameznih skupinah vzorcev, izmerjen po sušenju vzorcev na sobni temperaturi eno uro.

Delež izgubljene teže pri sušenju skleninskih vzorcev stalnih vitalnih zob na sobni temperaturi je odvisen od starosti bolnikov ($p < 0,05$) (Diagram 3).

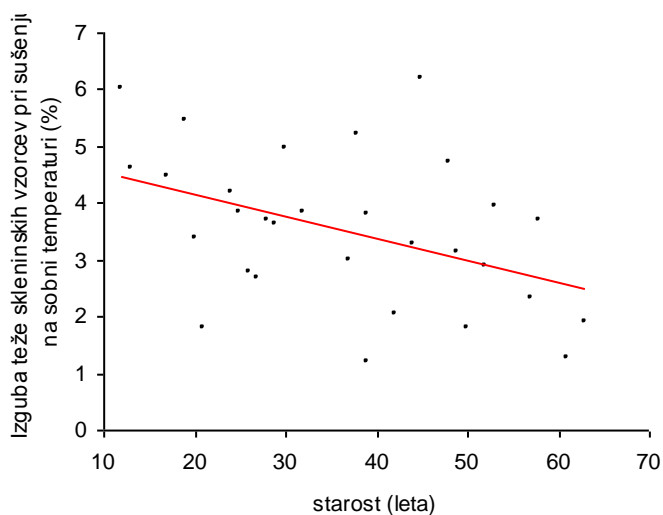


Diagram 3: Delež izgubljene teže skleninskih vzorcev stalnih vitalnih zob pri sušenju na sobni temperaturi eno uro v odvisnosti od starosti pacientov.

Difuzijski koeficienti so premo sorazmerno odvisni od količine vode v skleninskih vzorcih ($p < 0,05$) (Diagram 4).

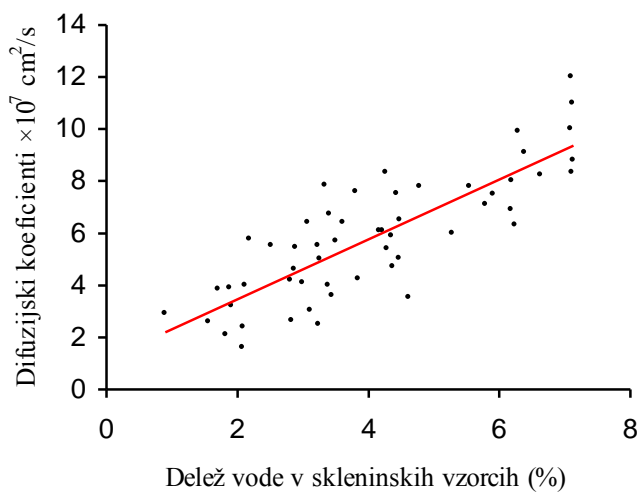


Diagram 4: Difuzijski koeficienti v odvisnosti od deleža vode v skleninskih vzorcih.

5. RAZPRAVA

Za razvoj kariesa v sklenini je potreben transport kislin v in transport mineralnih gradnikov iz področja demineralizacije skozi povrhnjo intaktno skleninsko

plast. Čeprav je problem izredno zanimiv s stališča fiziološke zaščite izraščajočih stalnikov, so raziskovalci pojav zmanjšane prepustnosti sklenine mlečnih zob pred izpadom osvetlili le enkrat in ugotovili, da se prepustnost sklenine mlečnih zob zmanjša med procesom resorpcije korenine (Atkinson in Mathews, 1949).

Med skupino skleninskih vzorcev, ki smo jih izrezali mlečnim zobem s popolnoma resorbiranimi koreninami (skupina B), in skupino skleninskih vzorcev, ki smo jih izrezali mlečnim zobem z delno resorbiranimi koreninami (skupina A), smo izmerili statistično pomembno razliko v prepustnosti ($p < 0,01$) za vodopni spinski označevalec TMAPO. Povprečni difuzijski koeficient v skupini B je znašal $3,22 \pm 0,66 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ in je bil 3,3-krat manjši kot v skupini A, kjer je znašal $10,72 \pm 2,83 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. Na podlagi edine znane raziskave (Atkinson in Mathews, 1949) smo dobljene rezultate pričakovali.

Z metodo sušenja vzorcev na sobni temperaturi (Burnett in Zenewitz, 1958) smo v skleninskih vzorcih izmerili tudi količino vode, ki predstavlja medij za difuzijske procese. Med skupinama A in B smo izmerili statistično pomembno razliko v količini vode ($p < 0,01$). V skupini B je delež vode znašal $2,04 \pm 0,16 \%$ in je bil 2,9-krat manjši kot v skupini A, kjer je znašal $6,03 \pm 0,62 \%$.

Razlika v količini vode med skupinama vzorcev ustreza razliki v velikosti difuzijskih koeficientov. Zmanjšane vrednosti difuzijskih koeficientov v skupini mlečnih zob z resorbiranimi koreninami so najverjetneje posledica zmanjšane količine vode v sklenini.

Večina raziskav difuzijskih procesov v sklenini je bila narejena na izruvanih zobeh. Redke raziskave na živih zobeh, predvsem živalskih, so pokazale, da potekajo difuzijski procesi mnogo hitreje v živih kot v mrtvih zobeh, vendar so si rezultati teh raziskav zelo različni ali pa si celo nasprotujejo (Barlestone, 1951, Tarbet in Fosdick, 1971, Zahradnik in Moreno, 1975).

Določili smo razliko v prepustnosti in količini vode v sklenini stalnih živih in stalnih devitaliziranih človeških zob. Zobje so bili devitalizirani najmanj dve leti, preden smo jih izruvali. Rezultati so pokazali statistično pomembno razliko v prepustnosti sklenine za TMAPO med skupinama stalnih vitalnih zob (skupina C) in stalnih zob, ki so bili devitalizirani (skupina D), šele pri 10 % stopnji tveganja ($p < 0,1$). V skupini C je znašal povprečni difuzijski koeficient $7,03 \pm 0,61 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ in

je bil 1,2-krat večji kot v skupini D, kjer je znašal $5,75 \pm 0,28 \times 10^{-7}$ cm²/s. Tarbet in Fosdick (1971) sta v raziskavah na stalnih človeških zobeh ugotovila desetkrat hitrejšo difuzijo akriflavina in NaF v *in vivo* pogojih (na vitalnih zobeh) v primerjavi z *in vitro* pogoji (tri tedne avitalni zobje shranjeni v fiziološki raztopini). Naše ugotovitve se razlikujejo od zgoraj navedenih, saj smo v sklenini devitaliziranih zob izmerili le 1,2-krat manjšo hitrost difuzije za TMAPO. Naša raziskava je bila v celoti opravljena v *in vitro* pogojih. Dovolili smo si primerjati žive in devitalizirane stalne zobe po izruvanju. Meritve so bile opravljene čim prej po izruvanju zob, vendar najkasneje v dvajsetih urah. Menimo, da čas od izruvanja do meritve ni bistveno vplival na lastnosti prepustnosti, kakršne ima sklenina živih in devitaliziranih zob, ko so še v ustni votlini. Razliko v rezultatih med našo študijo in študijo Tarbeta in Fosdicka pripisujemo učinku tlaka zunajcelične tekočine v živi zobni pulpi, ki se lahko vzdržuje le v *in vivo* pogojih. Takoj po izruvanju zoba se zaradi prekinitve prekrvavitve homeostatski mehanizem poruši.

Delno bi lahko razlike pripisovali tudi različnim lastnostim molekul, ki so bile uporabljene v študijah. TMAPO je polarna vodotopna molekula z molekulsko maso 226. V primerjavi s fluoridnim ionom in akriflavinom je TMAPO precej večja molekula, tako da bi ji po teoriji prehajanja nenabitih molekul skozi sklenino (sklenina kot molekularno sito) lahko pripisali počasnejši vdor (Darling in sod., 1961, Poole in Stack, 1965). Vendar po drugi strani fluoridni ion kaže afiniteto do kristalov kalcijevega hidroksiapatita (Grön, 1971), zaradi česar bi lahko prodiral v sklenino celo počasneje kot večja molekula našega spinskega označevalca (TMAPO). Akriflavin je večja molekula kot fluoridni ion in manjša kot TMAPO, vendar je njen prodor v sklenino oviran zaradi negativnega naboja skleninskih por, ki so glavni kanali za prehod delcev (Amberson in sod., 1926, Klein in Amberson, 1929, Chick in Waters, 1963).

Razlike v rezultatih so lahko delno tudi posledica različnih merilnih tehnik: ultravioletna mikroskopija, elektronska mikroskopija, odpornost na jedkanje sklenine (Tarbet in Fosdick, 1964, Tarbet in Fosdick, 1971) v primerjavi z EPR metodo, ki smo jo prvi uporabili za primerjanje prepustnosti živih in mrtvih zob.

V vzorcih obeh skupin smo izmerili tudi količino vode, s čimer smo podprli rezultate meritev z metodo EPR. Rezultati so pokazali, da je utežni delež vode v stalnih devitaliziranih zobeh statistično pomembno manjši kot v stalnih vitalnih zobeh

(C: $4,02 \pm 0,7 \%$, D: $3,82 \pm 0,67 \%$) šele pri 10 % stopnji tveganja ($p < 0,1$). V skupini C je delež vode 1,05-krat večji kot v skupini D, kar podpre izmerjeno razliko v difuzijskih koeficientih med živimi in devitaliziranimi zobmi.

V raziskavi smo izmerili tudi difuzijske koeficiente v skleninskih vzorcih stalnih vitalnih zob bolnikov s povprečno starostjo 49,1 let (skupina E) in jih primerjali s povprečnim difuzijskim koeficientom skupine stalnih vitalnih zob bolnikov s povprečno starostjo 24,1 let (skupina C). Izmerjen difuzijski koeficient v skupini C ($7,03 \pm 0,61 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$) je bil 1,6-krat večji od izmerjenega difuzijskega koeficienta v skupini E ($4,45 \pm 0,37 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$). Povprečna difuzijska koeficienta obeh skupin sta se statistično razlikovala ($p < 0,05$).

Rezultati naše raziskave so potrdili ugotovitve raziskovalcev, da je prepustnost sklenine stalnih zob obratno sorazmerna času izpostavljenosti zoba okolju ustne votline (Atkinson, 1947, Arends in sod., 1966, Melberg in Nicholson, 1968, Nicholson in Melberg, 1969, Brudevold in sod., 1982) (Diagram 1).

Meritve smo podprli z merjenjem količine vode v sklenini. Skleninski vzorci iz skupine C so vsebovali $4,02 \pm 0,7 \%$ vode, kar je v primerjavi s skupino E ($3,16 \pm 0,71 \%$) 1,2-krat več. Rezultati so potrdili ugotovitve predhodnjih raziskav, da količina proste vode v sklenini pada z večjo starostjo bolnikov (Bird in sod. 1940, Burnett in Zenewitz, 1958, Little in sod., 1962, Carlström in sod., 1963, Myers, 1965, Poole in Stack, 1965, Casciani, 1971, Zahradnik in Moreno, 1975, Little in Casciani, 1981) (Diagram 3).

Primerjali smo tudi izmerjene difuzijske koeficiente mlečnih zob z neresorbiranimi koreninami (skupina A) in stalnih zob (skupine C, D, E) in ugotovili, da se povprečni difuzijski koeficienti statistično pomembno razlikujejo ($p < 0,05$). Povprečni difuzijski koeficient v skupini A ($10,72 \pm 2,83 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$) je bil 1,5-krat večji od povprečnega difuzijskega koeficienta v skupini C ($7,03 \pm 0,61 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$), 1,8-krat večji od povprečnega difuzijskega koeficienta v skupini D ($5,75 \pm 0,28 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$) in 2,4-krat večji od povprečnega difuzijskega koeficienta v skupini E ($4,45 \pm 0,37 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$). Izmerjene vrednosti so primerljive z do sedaj znanimi ugotovitvami. Barvila so prehajala skozi sklenino mlečnih zob 1,5-krat hitreje kot skozi sklenino stalnikov (Featherstone in sod., 1981), F^- in C^{14} -klorheksidin sta skozi mlečno sklenino prehajala kar tridesetkrat hitreje kot skozi sklenino stalnih zob

(Linden in sod., 1986), difuzijski koeficienti za vodotopne spinske označevalce pa so bili dvakrat večji v sklenini mlečnih zob v primerjavi s sklenino stalnih zob (Skaleric in sod., 1975).

Podoben vzorec razporeditve po posameznih skupinah opazimo tudi pri povprečnih utežnih deležih vode. Tudi tu se deleži vode po posameznih skupinah statistično pomembno razlikujejo ($p < 0,01$).

Zanimivo je, da je povprečni difuzijski koeficient, določen v skupini mlečnih zob z resorbiranimi koreninami (skupina B), statistično pomembno manjši ($p < 0,01$) ne samo od povprečnega difuzijskega koeficienta iz skupine mlečnih zob z neresorbiranimi koreninami (skupina A), ampak tudi od povprečnih difuzijskih koeficientov, ki smo jih določili v skupinah stalnih zob ($p < 0,05$). Izmerjena vrednost v skupini B je bila 2,2-krat manjša kot v skupini C, 1,8-krat manjša kot v skupini D in 1,3-krat manjša kot v skupini E. Delež proste vode je bil v skupini B 1,9-krat manjši kot v skupini C, 1,8-krat manjši kot v skupini D in 1,6-krat manjši kot v skupini E. Vzorec razporeditve povprečnih količin vode v posameznih skupinah vzorcev je podoben kot pri razporeditvi povprečnih difuzijskih koeficientov ($p < 0,05$).

Iz rezultatov lahko sklepamo, da je hitrost difuzije v sklenini mlečnih in stalnih zob močno odvisna od količine vode (Diagram 4).

Metodo elektronske paramagnetne resonance (EPR) uporabljajo na številnih biomedicinskih področjih (Kappusamy in sod., 1998, Gallez s sod., 1999). Najvidnejše mesto ji pripada na področju onkoloških in nevroloških raziskav, kjer je v ospredju merjenje količine dušikovih in kisikovih prostih radikalov v tumorskih celicah in membranah živčnih celic (Goda in sod., 1996, Sersa in sod., 2001). Metodo so že uporabili za raziskave prepustnosti trdih zobnih tkiv (Skaleric in sod., 1975, Skaleric in sod., 1983). Naši rezultati o razmerju prepustnosti sklenine mlečnih in stalnih zob za vodotopne spinske označevalce so primerljivi z rezultati prejšnjih raziskav (Skaleric in sod., 1975).

V naši raziskavi smo poleg merjenja difuzijskih koeficientov z metodo EPR merili tudi utežne deleže vode v sklenini, ki predstavlja medij za difuzijske procese. Razmerje povprečnih deležev v posameznih skupinah je podobno razmerju povprečnih določenih difuzijskih koeficientov, kar govori v prid ustreznosti metode za tovrstne raziskave. Rezultati drugih študij o prepustnosti sklenine za različne delce s podobnimi molekularnimi lastnostmi, kot jih ima TMAPO, se razlikujejo od naših.

Izmerjeni difuzijski koeficienti v sklenini pasjih zob (Burke in Moreno, 1975), goveda (Borggreven in sod., 1977) in ljudi (Braden in sod., 1971) odstopajo od naših meritev za vrednost velikostnega reda 10^{-1} , kar lahko pripišemo različnim lastnostim delcev, ki so jih uporabili v poizkusih, različnim metodam in pogojem, v katerih so bile raziskave izvedene.

V raziskavi smo uporabili posebej za to nalogo osnovan matematični model, ki sloni na analizi efektivnosti spinske izmenjave in podaja možne koncentracijske profile ob danem času po inkubaciji. S tem določa hitrost difuzije oziroma prepustnost zobne sklenine za prehajanje spinskih označevalcev in njim podobnih molekul. Model omogoča določitev difuzijske konstante za spinski označevalec brez snemanja EPR spektrov z gradientom magnetnega polja, kar do sedaj ni bilo mogoče. Glede na dobljene rezultate in zgoraj omenjene primerjave lahko rečemo, da se je model izkazal za uporabnega.

Naši rezultati podpirajo ugotovitve predhodne raziskave (Atkinson in Mathews, 1949), da je prepustnost sklenine mlečnih zob z resorbiranimi koreninami manjša kot v mlečnih zobeh z neresorbiranimi koreninami. Vzroke za to bi lahko iskali v fizioloških spremembah v mlečnem zobu med procesom resorpcije korenine. Domneva o fiziološki zaščiti izraščajočega stalnika z manj prepustno sklenino krone mlečnika tik pred njegovim izpadom in izrastjo stalnika je še neraziskana in predstavlja področje, ki smo se ga z našo raziskavo šele dotaknili. Ugotovitve kažejo na dodaten pomen ohranitve zdravih mlečnih zob do izrasti stalnikov, saj njihova zmanjšana prepustnost tik pred izpadom kaže na možno vlogo pri zaščiti stalnih zob.

Ugotovljena zmanjšana prepustnost devitaliziranih zob skupaj z ugotovitvami o vlogi prepustnosti sklenine pri karioznem procesu (Silverstone, 1973, Gray in sod., 1974, Higuchi, 1974, Moreno in Zahradnik, 1974) nakazuje možnost, da so devitalizirani zobje bolj odporni proti kariesu kot živi.

6. ZAKLJUČKI

1. Med procesom resorpcije korenin mlečnih zob opazimo zmanjšano prepustnost sklenine za vodotopni spinski označevalec in zmanjšano vsebnost vode v sklenini.
2. Devitalizirani stalni zobje imajo manj prepustno sklenino za vodotopni spinski označevalec in manj vode v sklenini kot zobje, ki so ob izruvanju imeli živo pulpo.
3. Sklenina mlečnih zob je bolj prepustna za vodotopni spinski označevalec in vsebuje več vode kot sklenina stalnih zob.
4. S staranjem postaja sklenina stalnih zob manj prepustna za vodotopni spinski označevalec in izgublja vodo.
5. Difuzijski procesi so odvisni od količine vode v sklenini.

7. ZAHVALA

Prof. dr. Uroš Skalerič, dr. stom., višji svetnik, je s svojim znanjem, izkušnjami in izvirnostjo delu postavil temelje. Zahvaljujem se mu za žrtvovani čas in energijo.

Natančnost in napotki **prof. dr. Dominika Gašperšiča, dr. stom.**, so me pripeljali do željenega cilja. Hvala.

Umirjenost somentorice **doc. dr. Narcise Košir, dr. stom.**, mi je bila v uteho v raztresenih trenutkih. Hvala.

Dr. Janez Štrancar z Inštituta Jožef Stefan je sestavil matematični model in računalniško obdelal rezultate. Upam, da soteskanje v Posočju ni bilo zadnje. Hvala.

Zahvaljujem se **Zorki in vsem na oddelku za fiziko trde snovi** za pomoč pri tehnični izvedbi naloge.

Sestriam Metki, Nataši in Adrijani prisrčna hvala za pomoč pri zbiranju vzorcev.

Hvala **Meliti Kermavnar**, študentki medicine, ki je z raziskovalnimi izkušnjami, požrtvovalnostjo in hitrimi prsti delu dala tisto, kar drugače ne bi nikoli imelo. Da bi bila vez, ki naju družijo, kot dež, ki mirno rosi, a napolni reko.

8. LITERATURA

1. Amberson WR, Williams RW, Klein H. Elektromotive phenomena in teeth and bones. *AM J Med Sci* 1926; 171: 926-7.
2. Angmar B, Carlström D, Glas JE. Studies on the ultrastructure of dental enamel. IV. The mineralization of normal human enamel. *J Ultrastruc Res* 1963; 8: 12-23.
3. Angmar Manson B. A polarization microscopic and micro x-ray diffraction study of the organic matrix of developing human enamel. *Arch Oral Biol* 1971; 16: 147-56.
4. Appelbaum E. The radiopaque surface layer of enamel and caries. *J Dent Res* 1940; 19: 41-6.
5. Arends J, Nelson DGA, Dijkman AG, Jongbloed WL. Effect of various flourides on enamel structure and chemistry. In: Guggenheim B (ed.). *Cariology Today*. Basel: Karger, 1978: 245-58.
6. Arends J, Schuthof J, Jongbloed WL. Mineral properties of the outer tooth surface In: Leach SA (ed.). *Dental Plaque and Surface Interactions in the Oral Cavity*. London: Information Retrieval, London Baud CA, 1976: 251-72.
7. Arends J. Enamel. In: Myör IA (ed.). *Reaction Paterns in Human Teeth*. Florida: CRC Press, 1965: 48-62.
8. Armstrong WG, Hayward AF. Acquired organic integuments of human enamel: a comparison of analytical studies with optical, phase contrast and electron microscope examinations. *Caries Res* 1968; 2: 294-305.
9. Atkinson HF. An investigation into the permeability of human enamel by using osmotic method. *Br Dent J* 1947; 83: 205-14.
10. Atkinson HF, Mathews E. An investigation into the permeability of human deciduous enamel. *Br Dent J* 1949; 86: 142-5.
11. Avery JK (ed.). *Oral development and histology*. 2nd ed. New York: Thieme Medical Publishers, Inc., 1994.
12. Barlestone HJ. Radioactive penetration through intact enamel with uptake by bloodstream and thyroid gland. *J Dent Res* 1951; 30: 728-33.
13. Bergman G, Lind PO. A Quantitative microradiographic study of incipient enamel caries. *J Dent Res* 1966; 45: 1477-84.
14. Besic FC, Bayard M, Wieman MR, Burell KH. Composition and structure of dental enamel: Elemental composition and crystalline structure of dental enamel as they relate to its solubility. *J A D A* 1975; 91: 594-601.

15. Beynon AD. A reappraisal of Sudan black staining of enamel matrix in the mouse molar. *Arch Oral Biol* 1976; 21: 83-90.
16. Biby BG. Organic enamel material and caries. *Caries Res* 1971; 5: 305-22.
17. Bird, et al. Chemical analysis of deciduous enamel and dentine. *J Dent Res* 1940; 19: 413-23.
18. Bodecker CWF. Tooth resistance; important predisposing factor in dental caries. *N.Y. State Dent J* 1960; 26: 119-31.
19. Borggreven JM, Driessens FC. Effect of various aliphatic amines on permeability of bovine dental enamel. *Arch Oral Biol* 1986; 31: 341-4.
20. Borggreven JMPM, van Dijk JWE, Driessens FCM. A quantitative radiochemical study of ionic transport in bovine enamel. *Arch Oral Biol* 1977; 22: 467-72.
21. Braden M, Duckworth R, Jostone-Bechal S. The uptake of Na²⁴ by human dental enamel. *Arch Oral Biol* 1971; 16: 367-74.
22. Brudevold F, Aasenden R, Bakhos Y. A preliminary study of post-eruptive maturation of teeth in situ. *Caries Res*; 1982; 16: 243-8.
23. Brudevold F, Söremark R. Chemistry of the mineral phase of enamel. V: Miles (ed.). *Structural and chemical organisation of the teeth*. New York and London: Academic Press, 1967: 247-77.
24. Brudevold F, Steadman LT, Smith FA. Inorganic and organic components of tooth structure. *Ann N Y Acad Sci* 1960; 85: 110-32.
25. Bruun C. Uptake and retention of fluoride by intact enamel in vivo after application of neutral sodium fluoride. *Scand J Dent Res*; 81: 92-100.
26. Burges RC, Nikiforuk G, Maclaren C. Chromatographic studies on carbohydrate components in enamel. *Arch Oral Biol* 1960; 3: 8-14.
27. Burke EJ, Moreno EC. Diffusion fluxes of tritiated water across human enamel membranes. *Arch Oral Biol* 1975; 20: 327-32.
28. Carey CM, Vogel GL, Chow CL. Permeability of sound and carious human dental enamel as measured by membrane potential. *J Dent Res* 1991; 70: 1479-85.
29. Casciani FS. Identification of hydrate water in enamel, dentine, cementum and bone. In: Fearnhead RW, Stack MV (eds.). *Tooth enamel II*. Bristol: John Wright, 1971: 14- 23.

30. Cevc P, Schara M, Ravnik C, Skaleric U. Study of the arrangement of crystallites in γ -irradiated human enamel by electron paramagnetic resonance. *J Dent Res* 1976; 55: 691-5.
31. Chick AO, Waters NE. Membrane potential in teeth: application of some common anions to enamel. *J Dent Res* 1963; 42: 934-42.
32. Coolidge TB. Biochemistry of the sheath space in caries. *Ann N Y Acad Sci* 1965; 131: 884-92.
33. Darling AI, Mortimer KV, Poole DFG. Molecular sieve behaviour of normal and carious human dental enamel. *Arch Oral Biol* 1961; 5: 251-73.
34. Dibdin GH. The water in human dental enamel and its diffusional exchange measured by clearance of tritiated water from enamel slabs of varying thickness. *Caries Res* 1993; 27: 81-6.
35. Dibdin GH. The internal surface and por structure of enamel. *J Dent Res* 1969; 48: 771-6.
36. Eastoe JE. The amino acid composition of proteins from the oral tissues. II. The matrix proteins in dentine and enamel from developing human deciduous teeth. *Arch Oral Biol* 1963; 8: 633-52.
37. Featherstone JDB, Melberg JR. Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. *Carie Res* 1981; 15: 109-14.
38. Fish EW. Age changes in the permeability of dog's enamel. *J Physiol* 1931; 72: 321-6.
39. Fosdick LS. Some theoretical aspects of tooth permeability. *J Dent Med* 1963; 3: 144- 7.
40. Frank MR, Sognanes RF, Kern R. Calcification of Dental Tissues with special reference to enamel infrastructure. In: *Calcification in biological systems*. Amer Ass Adv Sci, Washington 1960, 163-202.
41. Glass JE. Studies on the ultrastructure of Dental enamel. II: The orientation of the apatite crystalites as deduced from X-ray diffraction. *Arch Oral Biol* 1962; 7: 91-104.
42. Glimcher MJ, Friberg UA, Levine PT. The isolation and amino acid composition of enamel proteins of erupted bovine teeth. *Biochem J* 1964; 93: 202-10.
43. Goda F, Bacic G, O'Hara JA, Gallez B, Schwartz HM, Dunn JF. The relationship between partial pressure of oxygen and perfusion in two murine tumors after X ray irradiation: a combined gadopentetate dimeglumin dynamic

- magnetic resonance imaging and in vivo electron paramagnetic resonance oximetry study. *Cancer Res* 1996; 56: 3344-9.
44. Gray JA, Francis MD, Gribstein WJ. Chemistry of enamel dissolution. In: Sognnaes RF (ed.). *Chemistry and Prevention of Dental Caries*. Springfield: Thomas, 1975: 164-79.
 45. Grön P. Chemistry of topical fluorides. *Caries Res* 1971; 11: 172-91.
 46. Gwinet AJ. The ultrastructure of the prismless enamel of deciduous teeth. *Arch Oral Biol* 1966; 11: 1109-15.
 47. Gwinet AJ. The ultrastructure of the prismless enamel of permanent human teeth. *Arch Oral Biol* 1967; 12: 381-7.
 48. Hamilton WJ, Judd G, Ansell GS. Ultrastructure of human enamel specimen prepared by ion micromiling. *J Dent Res* 1973; 52: 703-10.
 49. Hardwick JL. Isotope studies on the penetration of glucose into normal and carious enamel and dentine. *Arch Oral Biol* 1961; 4: 97-100.
 50. Higuchi WJ. Kinetic factors in the tooth saliva model system. *J Dent Res* 1974; 53: 236-8.
 51. Hofman S, McEvan SW, Drew MC. Scanning electron microscope studies of EDTA treated enamel. *J Dent Res* 1969; 48: 1234-42.
 52. Holly FJ, Gray JA. Mechanism of incipient caries lesion growth utilizing a physical model based on diffusion concepts. *Arch Oral Biol* 1968; 13: 319-34.
 53. Jenkins GN. Chemical composition of the teeth. In: *The physiology and biochemistry of the mouth*, 4th ed. Oxford, London, Edinburgh, Melbourne: Blackwell scientific publications, 1978: 54-112.
 54. Jojstone-Bechal S, Duckworth R, Braden M. Diffusion of radioactive ions into human dental enamel. *Arch Oral Biol* 1971; 16: 375-84.
 55. Kappusamy P, Afevorski M, Shankar RA, Coffin D; Krishna MC; Hahn SM; Mitchell JB; Zweier JL. In vivo electron paramagnetic resonance imaging of tumor heterogeneity and oxygenation in a murine model. *Cancer Res* 1998; 58: 1562-8.
 56. Keckaert GA. Electron microscopy of human carious dental enamel. *Arch Oral Biol* 1973; 18: 751-8.
 57. Kerebel B, Daculsi G, Verbaere A. High resolution electron microscopy and crystallographic study of some biological apatites. *J Ultrastruc Res* 1976; 57: 266-75.

58. Klein H, Amberson WR. A physico - chemical study of the structure of the dental enamel. *J Dent Res* 1929; 9: 667-88.
59. Leus PA. Biophysical methods of influencing the permeability of dental enamel. *Stomatologia* 1969; 48: 21-4.
60. Linden LA, Björkman S, Hattab F. The diffusion in vitro of fluoride and chlorhexidine in the enamel of human deciduous and permanent teeth. *Arch Oral Biol* 1986; 31: 33-7.
61. Linden LA. Microscopic observations of fluid flow through enamel in vitro. *Odontologisk Revy* 1968; 19: 349-65.
62. Little MF, Casciani FS. The nature of water in sound enamel: a preliminary study. *Arch Oral Biol*; 11: 565-71.
63. Little MF, Cueto EI, Rowley J. Chemical and physical properties of altered and sound enamel. I. Ash, Ca, P, CO₂, N, water, microradiolucency and density. *Arch Oral Biol* 1962; 7: 173-84.
64. Lobjoe DP. Biophysical investigation on the mineral phase in the superficial layers of human dental enamel. *Helv Odont Acta* 1966; 10: 40-6.
65. Lyon DG, Darling AI. Orientation of the crystalites in human dental enamel. *Brit Dent J* 1957; 102: 483-8.
66. Meckel AH, Gribstein WJ, Neal RJ. Structure of mature dental enamel observed by electron microscopy. *Arch Oral Biol* 1965; 10: 775-83.
67. Melberg JR, Nicholson CR. In vitro fluoride uptake by erupted and unerupted tooth enamel. *J Dent Res* 1968; 4: 124-6.
68. Moreno EC, Burke EJ. A diaphragm cell and the procedure for studying isothermal diffusion in dental enamel. *Arch Oral Biol* 1974; 19: 417-20.
69. Moreno EC, Zahradnik RT. Chemistry of enamel subsurface demineralisation. *J Dent Res* 1974; 53: 226-36.
70. Moreno EC, Zahradnik RT. The pore structure of human dental enamel. *Arch Oral Biol* 1973; 18: 1063-8.
71. Mortimer KV. The relationship of deciduous enamel structure to dental disease. *Caries Res* 1970; 4: 206-23.
72. Myers HM. Trapped water of dental enamel. *Nature* 1965; 206: 713-4.
73. Nakata T, Yamamota K, Matsuo S, Nishimoto T, Akai M. Nature and distribution of mucosubstances in human mature enamel identified by enzyme electron microscopy. *Arch Oral Biol* 1982; 27: 431-3.

74. Nicholson CR, Melberg JR. Effect of natural fluoride concentration of human tooth enamel on fluoride uptake in vitro. *J Dent Res* 1969; 48: 302-6.
75. Nyvad B, Feyerskov O, Josephsen K. Organic structures of developmental origin in human surface enamel. *Scan Dent Res* 1988; 96: 288-92.
76. Odutuga AA, Prout RES. Lipid analysis of human enamel and dentine. *Arch Oral Biol* 1974; 19: 729-31.
77. Patterson CM, Kruger BJ, Daley TJ. Lipid and protein histochemistry of enamel effects of fluoride. *Calcif Tiss Res* 1977; 24: 119-29.
78. Poole DFG, Brooks AW. The arrangement of crystalites in enamel prisms. *Arch Oral Biol* 1961; 5: 14-26.
79. Poole DFG, Stack MV. The structure in physical properties of enamel In: Stack MV and Fearnhead (eds.) *Tooth Enamel*. Bristol: John Wright, 1965: 172-6.
80. Prout RES, Odutuga AA. Fatty acid composition of neutral lipids and fosfolipids of enamel and dentine from human molars. *Arch Oral Biol* 1974; 19: 293-8.
81. Rao KS. Hysteresis on the sorbtion of water on rice. *Curent Sci* 1939; 8: 256-7.
82. Rao KS. Elasticity of organo gels in relation to hysteresis in sorption. *Current Sci* 1940; 9: 19-21.
83. Ravnik Č. Retikuloendotelijska pregrada zobne pulpe. Doktorska disertacija. Ljubljana, 1969.
84. Ripa LW, Gwinet AJ, Buonocore MG. The prismless outer layer of deciduous and permanent enamel. *Arch Oral Biol* 1966; 11: 41-8.
85. Robinson C, Lowe NR, Weatherell JA. Amino acid composition, distribution and origine of "tuft" protein in human and bovine dental enamel. *Arch Oral Biol* 1975; 20: 29-42.
86. Robinson C, Weatherell JA, Halsworth AS. Variation of composition of dental enamel within thin ground tooth sections. *Caries Res* 1971; 5: 44-57.
87. Röla G. Effects of fluoride on inhibition of plaque formation. *Caries Res* 1977; 11: 243-52.
88. Ronholm E. The amelogenesis of human teeth as revealed by electron microscopy: II. The development of the enamel crystallites. *J Ultrast Res* 1962; 6: 249-303.

89. Scott DD, Simmelink JW, Nygaard V. Structural aspects of dental caries. *J Dent Res*; 53: 165-78.
90. Sersa G, Krzic M, Sentjurc M, Ivanusa T, Beravs K, Cemazar M, Auersperg M, Swartz HM. Reduced tumor Oxygenation by treatment with vinblastine. *Cancer Res* 2001; 61: 4266- 71.
91. Shapiro IM, Wurthier RE, Irving JT. A study of the fosfolipids of bovine dental tissues.I. Enamel matrix and dentine. *Arch Oral Biol* 1966; 11: 501-12.
92. Sharpe AN. Influence of the crystal orientation on in human enamel on its reactivity to acid as shown by high resolution microradiography. *Arch Oral Biol* 1967; 12: 583-91.
93. Silness J, Hegdahl T, Gustavsen F. Area of the organic - inorganic interface of dental enamel. *Acta Odont Scand* 1973; 31: 123-9.
94. Silverstone LM, Johnson NW. The effect on sound enamel of exposure to calcifying fluids in vitro. *Caries Res* 1971; 5: 323-42.
95. Silverstone LM. Structure of carious enamel, including the early lesion. *Oral Sci Rev* 1973; 3: 100-60.
96. Silverstone LM. Surface phenomena in dental caries. *Nature* 1967; 214: 203-4.
97. Skaleric U, Ravnik C, Cevc P. Microcrystal arrangement in human deciduous dental enamel studies by electron paramagnetic resonance. *Caries Res* 1982; 16: 47-50.
98. Skaleric U, Ravnik C, Schara M, Cevc P. Tooth enamel permeability for noncharged molecules. *Period Biol* 1983; 85: 236-7.
99. Skalerič U. Študija urejenosti mikrokristalov in difuzije v zobni sklenini z metodo elektronske paramagnetne resonance. Magstrsko delo. Ljubljana, 1974.
100. Skaleric U, Ravnik C, Cevc P, Schara M. Tooth enamel spin label diffusion study. *Period Biol* 1975; 77: 140.
101. Skalerič U. Zobna sklenina – struktura in mehanizmi transporta molekul. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Doktorska disertacija, 1979.
102. Smales FC. Structural subunit in prisms of immature rat enamel. *Nature* 1975; 258: 772-3.
103. Smillie AC, VII. The chemistry of the organic phase of teeth. In: Zipkin I (ed.). *Biological mineralization*. John Wiley & Sons, New York 1973:139-63.
104. Spiers RL. The nature of surface enamel in human teeth. *Calcif Tiss Res* 1971; 8: 1-16.

105. Stack MV, Williams G. Quantitative variation in the total organic matter of enamel. *Brit Dent J* 1952; 92: 261-7.
106. Stack MV. Variation in the organic content of deciduous enamel and dentine. *Biochem* 1953; 54: 15.
107. Stack MV. Chemical organization of the organic matrix of enamel. In: Miles AEW (ed.). *Structural and Chemical Organization of the Teeth*. New York: Academic Press, 317-46.
108. Swancar JR, Scott DB, Njemirovsky Z. Studies on the structure of human enamel by replica method. *J Dent Res* 1970; 49: 1025-33.
109. Tarbet WJ, Fosdick LS. Permeability of human dental enamel to acriflavine and potassium fluoride. *Arch Oral Biol* 1971; 16: 95-6.
110. Thewlis J. The structure of teeth as shown by X-ray examination. Privy Council, Med Res Council, Special Report Series 1940: 238.
111. Tung MS, Brown WE. Characterization and modification of electrochemical properties of teeth. *J Dent Res* 1983; 62: 60-4.
112. Uduyuga AA, Prout RES, Hoare JR. Hydroxyapatite precipitation in vitro by lipids extracted from mammalian hard and soft tissues. *Arch Oral Biol* 1975; 20: 311-6.
113. Vogel JJ, Ennever J. Lipid dependent calcification of elephant tusk matrix. *J Dent Res* 1975; 54: 416.
114. Volf V, Vladar M, Seidel A. Distribution of labelled calcium, yttrium and chromium chelates of EDTA in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1971; 190: 110-23.
115. Waters NE. Electrochemistry of human enamel: selectivity to potassium in solutions containing calcium or phosphate ions. *Arch Oral Biol* 1975; 20: 195-201.
116. Waters NE. The selectivity of human dental enamel to ionic transport. *Arch Oral Biol* 1971; 16: 305-22.
117. Weatherell JA, Weidman SM, Eyre DR. Histological appearance and chemical composition of enamel proteins from mature human molars. *Caries Res* 1968; 2: 281-93.
118. Weidman SM, Eyre DR. Amino acid composition of enamel protein in the fully developed human tooth. *Caries Res* 1967; 1: 349-55.
119. Zahradnik RT, Moreno EC. Structural features of human dental enamel as revealed by isothermal water vapour sorption. *Arch Oral Biol* 1975; 20: 327-32.
