

Obraz i umiejscowienie wybranych elementów organicznych w szkliwie zębów bydła

BOGDAN MIŚKOWIAK, KATARZYNA MEHR*, PAWEŁ PIOTROWSKI*,
TERESA MATTHEWS-BRZozowska**

Katedra Histologii i Embriologii Wydziału II Lekarskiego AM, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań
oraz Katedra Optometrii i Biologii Układu Wzrokowego Wydziału II Lekarskiego AM, ul. Rokietnicka 5D, 60-806 Poznań

*Klinika Rehabilitacji Narządu Żucia Katedry Protetyki Stomatologicznej Wydziału II Lekarskiego AM,
ul. Bukowska 70, 60-567 Poznań

**Katedra i Klinika Stomatologii Zachowawczej i Periodontologii Wydziału II Lekarskiego AM, ul. Bukowska 70, 60-567 Poznań
oraz Katedra Ortopedii Szczękowej i Ortodontyki Wydziału Lekarsko-Stomatologicznego AM, ul. Krakowska 26, Wrocław

Miśkowiak B., Mehr K., Piotrowski P., Matthews-Brzozowska T.

Pattern and location of selected organic elements in bovine teeth enamel

Summary

Dental enamel exhibits a highly mineralised structure and contains not only mineral substances but also organic components. The fine organic elements in the enamel cannot be detected by clinical examinations and most frequently are recognised by *in vitro* studies. The aim of the present study was to assess selected organic elements of enamel: lamellae, tufts, spindles, bulbs and spheroids and to appraise the suitability of permanent bovine teeth as substitutes of permanent human teeth in dental studies. Examinations were performed on 205 permanent bovine teeth obtained from healthy 2.5- to 4.5-year-old individuals (of black-white lowland race). Tooth sections were obtained by cutting crowns, using a slow revolving diamond disc saw, cooled with distilled water. Following preliminary appraisal and within 24 hours, the sections were stained with various techniques, including azane, picric acid, hematoxylin + picric acid, hematoxylin, eosin, fuchsin, H+E according to Mallory and were then analysed under a Nikon Optiphot-2 light microscope. Variable distributions of the evaluated organic elements of enamel were noted but most of them were located in the projection of smooth surfaces, compared to their location in the projections of incisal margins or masticator surfaces in bovine teeth. Bovine permanent frontal teeth may provide a substitute for human teeth but bovine lateral teeth, however, seem to be of limited use in dental studies.

Keywords: bovine teeth, tooth enamel

Szklivo jest wysoce zmineralizowaną strukturą, syntetyzowane przez wyspecjalizowane komórki narządu szklivotwórczego. Ameloblasty i wydzielana macierz organiczna pozakomórkowa stanowią środowisko dla prawidłowego przebiegu mineralizacji i wzrostu kryształów szkliva. Poza substancją mineralną występują w nim pewne składowe organiczne (14, 20). Drobne elementy organiczne w szkliwie, określane także jako zmiany rozwojowe, są niemożliwe do stwierdzenia badaniem klinicznym i najczęściej rozpoznaje się je w badaniach *in vitro*.

Badania laboratoryjne związane z zagadnieniem morfologii i fizjologii w obrębie struktur zębów ludzkich podejmowane były stosunkowo często w oparciu o ekstrahowane ludzkie zęby przedtrzonowe, jak i zębony materiał zwierzęcy (4). Z danych piśmiennictwa wynika, że z uzębienia różnych gatunków bydła rodziny *Bovidae* wykorzystywano często grupę zębów siecznych do celów badawczych, takich jak: ocena i porównanie materiałów dentystycznych oraz syste-

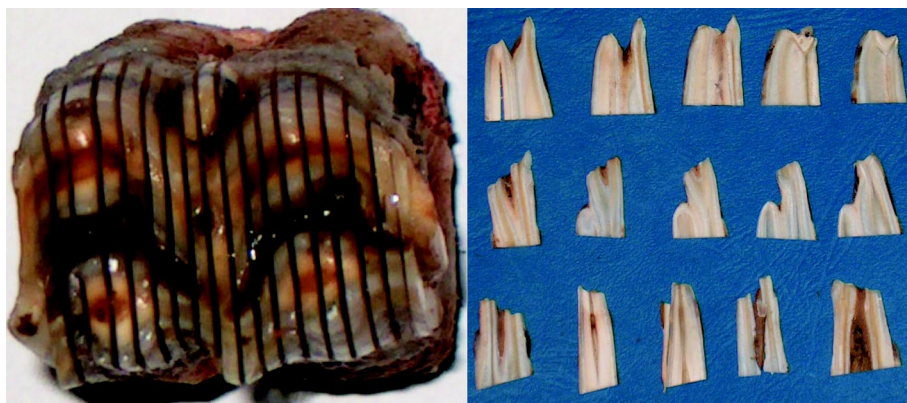
mów wiążących, ocena utraty minerałów, a także głębokości uszkodzeń w wyniku sterylizacji, uznając te zęby za podobne budową do ludzkich (1, 18, 21).

Celem pracy było określenie liczebności i lokalizacji wybranych elementów organicznych oraz ocena przydatności bydłych zębów stałych w badaniach stomatologicznych jako substytutu ludzkich zębów stałych.

Materiał i metody

Stale zęby bydłce pochodziły z uzębionych szczęk i zuchw 15 głów bydłych (rasa nizinna czarno-biała). Głowy zdrowych zwierząt od 2,5- do 4,5-letnich otrzymano od służb weterynaryjnych Zakładów Mięsnych Pozmeat S.A. w Poznaniu oraz Zakładów Mięsnych w Lesznie. Sporządzano im metryczkę i diagram, uwzględniając wyrzynanie i stan kliniczny koron zębów. Badanie powierzchni koron zębów przeprowadzono wizualnie.

Wybrano 205 wyrzniętych stałych zębów bydłych z różnych grup czynnościowych (zęby sieczne, przedtrzo-



Ryc. 1. Zdjęcie powierzchni trącej i skrawków z wyrżniętego drugiego zęba trzonowego

nowe i trzonowe). Po fotograficznym udokumentowaniu powierzchni korony zęba, przeprowadzono cięcia wzdłuż długiej osi zęba przez powierzchnie styczne bądź w płaszczyźnie językowo-podniebno/policzkowej. Zęby cięto przy użyciu wolnoobrotowej piły Isomet firmy Buehler z tarczą diamentową o grubości 0,1 mm chłodzoną wodą destylowaną. Z każdego zęba uzyskiwano 4-15 skrawków, każdy o grubości ok. 0,4 mm (ryc. 1). Następnie obie strony uzyskanych przekrojów szlifowano, wygładzając papierem ściernym. Skrawki zęba pojedynczo umieszczano w wodzie destylowanej, w oznaczonych sterylnych pojemnikach, które przez 1 min. poddawano wytrząsaniu w płuczce ultradźwiękowej. Łącznie otrzymano 1405 skrawków zębów bydłych. Uzyskane z koron zębów skrawki niebarwione najpierw obserwowano i rejestrowano, a następnie barwiono wybranymi technikami: azanem, kwasem pikrynowym, hematoksyliną + kwasem pikrynowym, hematoksyliną, eozyną, fuksyną, H+E oraz według Mallory'ego. Preparaty histologiczne przygotowywano w okresie nie przekraczającym 24 godzin od uboju. Obie strony przekrojów obserwowano w mikroskopie optycznym Nikon Optiphot-2 i dokumentowano przy użyciu oprogramowania Micro Image v.4.0. Dane dotyczące liczebności i lokalizacji rozpatrywanych elementów organicznych szkliwa zębów poddano analizie statystycznej (miary położenia i zmienności, test H Kruskala-Wallisa oraz U Manna-Whitneya).

Tab. 1. Zestawienie wartości charakterystyk odnoszących się do liczebności wybranych elementów organicznych szkliwa, przypadających na przekrój przez koronę zęba, w badanych grupach stałych zębów bydłych

Charakterystyki	Pęczki szkliwa			Wrzeciona szkliwa			Błaszki szkliwa		
	WZS	WZP	WZT	WZS	WZP	WZT	WZS	WZP	WZT
Minimum	3,90	3,10	1,90	26,40	11,90	18,30	4,00	1,60	3,00
Maksimum	8,90	11,60	13,80	91,50	164,50	168,40	10,30	8,80	13,30
Średnia arytmetyczna	6,10	6,00	7,80	62,40	76,80	98,40	5,60	5,20	7,80
Odchylenie standardowe	1,32	1,83	2,83	18,37	39,97	47,56	1,42	1,70	2,58
Współczynnik zmienności (%)	21,84	30,69	36,45	29,64	52,03	48,32	25,56	32,97	33,14

Objaśnienia: WZS – wyrżnięte zęby sieczne, WZP – wyrżnięte zęby przedtrzonowe, WZT – wyrżnięte zęby trzonowe

Wyniki i omówienie

Przykładowe obrazy pęczków, wrzecion i blaszek szkliwa stałych zębów bydła, niebarwionych i barwionych różnymi technikami przedstawiono na ryc. 2-4. Stwierdzono zależność widoczności badanych elementów organicznych szkliwa od techniki barwienia. Obserwacje pod różnymi powiększeniami sugerowały, że nie wszystkie z tych elementów były wystarczająco widoczne w preparatach barwionych azanem, kwasem pikrynowym, fuksyną. Natomiast

pozostałe barwienia umożliwiały jednoczesną obserwację pęczków, wrzecion, jak i blaszek szkliwa.

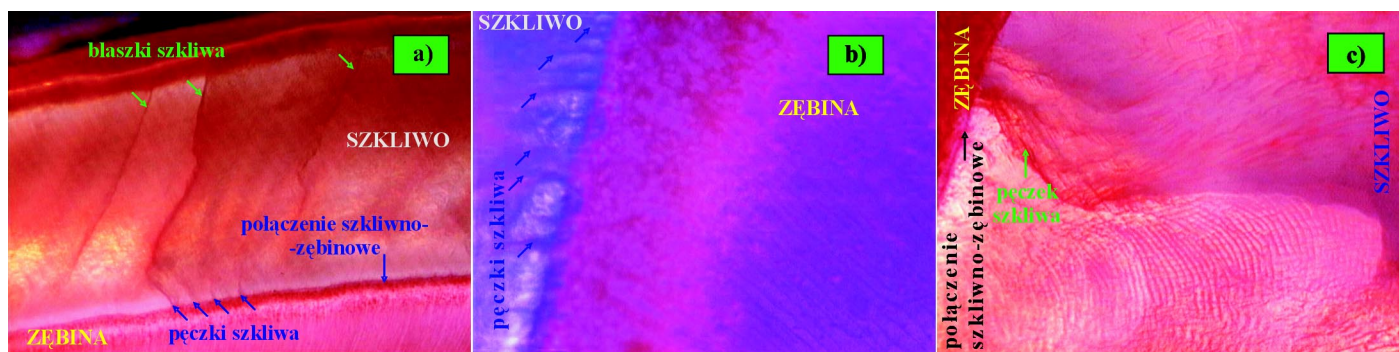
Na podstawie badań preparatów histologicznych, potwierdzono falisty i spiralny przebieg ułożenia pryzmatów szkliwa. Rzadziej obserwowany był układ pryzmatów zbliżony do prostoliniowego, postrzegany w warstwie podpowierzchniowej szkliwa. Stwierdzono różne kształty przekrojów pryzmatów, co wskazywało na ich złożone utkanie. W wewnętrznych warstwach szkliwa najczęściej występowały parazonie i diazonie, czasem widoczne przez całą grubość szkliwa.

W obrębie każdego skrawka w szkliwie strefy połączenia szkliwno-zębinowego (DEJ) stwierdzano pęczki i wrzeciona szkliwa o trójwymiarowej strukturze. Kształt pęczków szkliwa wykazywał pewną, określoną zmienność. Zbliżone były one budową do liści lub łodygi liścia i pozostawały w kontakcie z osłonkami przylegających pryzmatów. Obserwacja w mikroskopie nie wykazała określonych lokalizacji, do których ograniczało się występowanie pęczków szkliwa, jednak więcej było pęczków szkliwa na powierzchniach gładkich niż na brzegu siecznym czy powierzchni trącej.

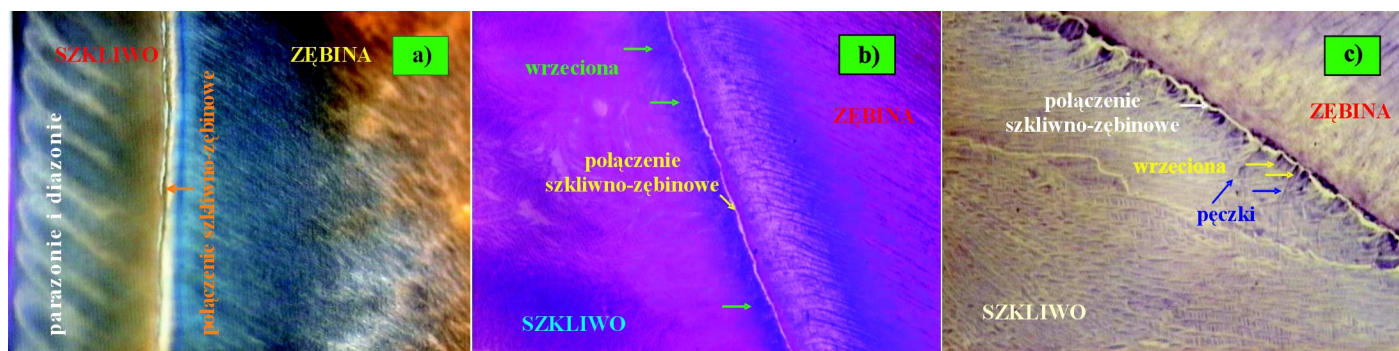
Wrzeciona szkliwa występowały w strefie DEJ, wykazując różnoraki przebieg, prostoliniowy bądź spiralny pod różnym kątem w stosunku do granicy DEJ.

Obrazy wskazywały, że wrzeciona szkliwa stanowią kontynuację kanałika lub kilku kanałików zębinowych w obszarze szkliwa strefy DEJ. Wrzeciona najliczniej obserwowane były w szkliwie w rzucie powierzchni gładkich.

Na preparatach zębów ze wszystkich badanych grup czynnościowych występowały blaszki szkliwa. Struktury te rozpoznawano jako rozpoczynające się od powierzchni szkliwa, a kończące przebieg na różnej głębokości szkliwa strefy DEJ, sporadycznie zagłębiające się w zębi-



Ryc. 2. Obrazy pęczków szkliwa pod różnymi powiększeniami po barwieniu: a) eozyną $\times 40$; b) fuksyną $\times 100$; c) według Mallory'ego $\times 200$



Ryc. 3. Obrazy wrzecion szkliwa pod różnymi powiększeniami po barwieniu: a) azanem $\times 40$; b) hematoksyliną $\times 100$; c) hematoksyliną i kwasem pikrynowym $\times 200$



Ryc. 4. Obrazy blaszek szkliwa pod różnymi powiększeniami: a) po barwieniu kwasem pikrynowym $\times 40$; b) bez barwienia $\times 100$; c) po barwieniu H+E $\times 200$

nę. Niektóre obrazy sugerowały możliwość istnienia ciągłości struktur blaszki i pęczka szkliwa.

Porównując poszczególne badane grupy czynnościowe zębów pod względem liczebności pęczków, wrzecion i blaszek szkliwa, stwierdzono znaczne zróżnicowanie ich liczebności zarówno w obrębie grup, jak i skrawków badanych zębów. W zębach trzonowych stwierdzono największe średnie liczebności w odniesieniu do rozpatrywanych elementów organicznych szkliwa, przypadających na przekrój przez koronę zęba (tab. 1).

Istotnym zagadnieniem dla przeprowadzenia badań histologicznych zębów bydlęcych było odpowiednie przygotowanie skrawków. W tej pracy uwzględniono doświadczenia innych autorów i analizowano preparaty przygotowane *ex tempore*. Wykorzystanie innej techniki niż cięcie zębów „na świeżo” mogło wpływać, zdaniem autorów, niekorzystnie na wynik bada-

nia poprzez destrukcyjne działanie substancji chemicznych na próbki zębów, utlenienie macierzy organicznej szkliwa, kryształów karboksy-hydroksyapatytów, jak i kolagenu zębiny (5).

Z dostępnego piśmiennictwa dotyczącego struktury szkliwa wynika, że stosowano różne techniki barwienia, głównie jednak zębów ludzkich. Były to różne techniki barwienia: według von Kossa (dla wykazania wapnia), błękitem toluidyny albo błękitem toluidyny i fuksyną zasadową (dla substancji organicznej), według Massona i van Gieson (dla włókien kolagenowych), błękitem alcjanu (dla kwaśnych glikozaminoglikanów) i PAS – dla glikoprotein i glikozaminoglikanów obojętnych (16). W piśmiennictwie nie znaleziono jednoznacznej sugestii co do techniki barwienia przydatnej w badaniach stomatologicznych, a raczej w zależności od celu i materiału badań stosowano różne techniki barwienia. Stąd na podstawie porównania

obrazów stwierdzono, że spośród kilku technik barwienia ukazywały one różnorodność w zakresie intensywności i kontraście barw ocenianych elementów organicznych szkliwa. Ponadto dawały możliwość porównania z obrazami histologicznymi zębów, wcześniejszych badań prowadzonych w Akademii Medycznej w Poznaniu. Badania te dotyczyły różnych aspektów, m.in. szczelności wypełnień i laków (6, 9-12).

Obserwacje wybarwionych preparatów z zębów bydlęcych sugerują podobieństwo pęczków, wrzecion i blaszek szkliwa do tych elementów występujących w zębach ludzkich (2, 13, 15). Występujące, udokumentowane duże zróżnicowanie zębów, a szczególnie w sposobie rozmieszczenia pryzmatów szkliwa w obrębie 14 gatunków *Bovidae*, np. *Chiroptera*, *Sirena*, *Cetacea* itd., zarówno stałych, jak i mlecznych powinno sugerować konieczność sprecyzowania rasy bydła w wykorzystywanym materiale zębowym w badaniach doświadczalnych. Dotąd opisano tylko ogólną charakterystykę struktur organicznych w szkliwie (8, 17, 19).

Stałe zęby bydła, użyte do tych badań, zaliczane do typu selenodontycznego (szkliwno-listewkowego) pochodziły od jednego gatunku bydła. Na przekroju poprzecznym skrawków charakteryzowało się to półksiężycowatym ułożeniem wokół lejka zęba listewki szkliwnej i otaczającej je zębiny. Szkliwo zębów bocznych wpuklało się lejkwato od strony powierzchni trącej w zębiny. Należałoby przyjąć, że uzębienie ludzkie i bydła cechuje odmienna budowa zębów (mniejsza grubość szkliwa u bydła), jak i funkcja związana z odmiennym typem przeżuwania pokarmu, co potwierdziło często występujące starcie powierzchni trących. Powierzchnie trące zębów przedtrzonowych i trzonowych *in situ* były ustawione skośnie, opadając w dół od strony języka ku policzkowi (3, 7).

Podsumowanie

Dolne stałe zęby sieczne pochodzące od bydła stosunkowo często stanowią substytut zębów ludzkich w badaniach laboratoryjnych w stomatologii (1, 18, 21). Niestety, brak jest w wymienionym piśmiennictwie badań przeprowadzonych na bocznych zębach bydła. Niniejsze badania, mimo iż dostarczyły wiele informacji poznawczych, potwierdzają jednak małą przydatność zębów bocznych bydła w stomatologicznych badaniach laboratoryjnych.

Piśmiennictwo

1. *Amaecha B. T., Higham S. M., Edgar W. M.*: Effect of sterilisation methods on the structural integrity of artificial enamel caries for intra-oral cariogenicity tests. *J. Dent.* 1999, 27, 313-316.
2. *Amizuka N., Uchida T., Fukae M., Yamada M., Ozawa H.*: Ultrastructural and immunocytochemical studies of enamel tufts in human permanent teeth. *Arch. Histol. Cytol.* 1992, 55, 179-190.
3. *Andrews A. H.*: Anatomy of the oral cavity, eruption, and developmental abnormalities in ruminants, [w:] Harvey C. E. (wyd.): *Veterinary Dentistry*. Saunders W. B. Co, Philadelphia 1985, 235-255.
4. *Arsenault A. L., Robinson B. W.*: The dentino-enamel junction: a structural and microanalytical study of early mineralization. *Calcif. Tissue Int.* 1989, 45, 111-121.

5. *Block M., Cowell C. R.*: The interpretation of scratches acquired on an enamel surface in vivo. *Br. Dent. J.* 1974, 136, 197-198.
6. *Czarnecka B., Miśkowiak B., Limanowska-Shaw H., Stopa J., Matthews-Brzozowska T.*: Histological study on the effect of air inclusions on the bonding of dental biomaterials. *J. Dent. Res.* 2003, 82, 578.
7. *Emily P., Orsini P. G., Lobprise H. B., Wiggs R. B.*: Oral and dental disease in large animals, [w:] Wiggs R. B., Lobprise H. B. (wyd.): *Veterinary Dentistry. Principles & Practice*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1997, 576-578.
8. *Glimcher M. J., Bonar L. C., Daniel E. J.*: The molecular structure the protein matrix of bovine dental enamel. *J. Mol. Biol.* 1961, 3, 541-546.
9. *Kaczmarek E., Matthews-Brzozowska T., Miśkowiak B.*: Digital image analysis in dental research applied for treatment of fissures on occlusal surfaces of premolars. *Ann. Biomed. Eng.* 2003, 31, 931-936.
10. *Matthews-Brzozowska T., Miśkowiak B., Mehr K.*: Stan szkliwa i zębiny bruzd powierzchni żującej zębów przedtrzonowych – badania histomorfometryczne. *Czas. Stomatol.* 2000, 53, 148-153.
11. *Matthews-Brzozowska T., Przybył J.*: System łączący Prompt – połączenie z materiałem wypełniającym i strukturami zęba. *Dent. Med. Probl.* 2002, 39, 2, 223-226.
12. *Matthews-Brzozowska T., Stopa J.*: Połączenie międzyfazowe tkanki zęba i materiału złożonego po zastosowaniu systemu łączącego nowej generacji. *Czas. Stomatol.* 2002, 55, 335-339.
13. *Mehr K.*: Computer-assisted analysis in histomorphometric studies of third molar teeth. 3rd International Conference of PhD Students, 13-19 August 2001, University of Miskolc, Hungary, Medical Science, Innovation and Technology Transfer Centre 2001, s. 125-130.
14. *Nyvad B., Fejerskov O., Josephsen K.*: Organic structures of developmental origin in human surface enamel. *Scand. J. Res.* 1988, 96, 288-292.
15. *Piattelli A., Trisi P.*: Morphodifferentiation and histodifferentiation of the dental hard tissues in compound odontoma: a study of undemineralized material. *J. Oral Pathol. Med.* 1992, 21, 340-342.
16. *Ragazzoni E., Martignoni M., Cocchia D.*: Caratteristiche morfologiche ed istochimiche delle strutture interprismatiche dello smalto umano. *Studio al microscopio ottico*. Minerva Stomatol. 1994, 43, 493-499.
17. *Sato I., Sunohara M., Mikami A., Yoshida S., Sato T.*: Comparison between deciduous and permanent incisor teeth in morphology of bovine enamel. *Okajimas Folia Anat. Jpn* 1999, 76, 131-136.
18. *Stopa J., Kurhańska-Fiłykowska A., Chmielnik M., Surdacka A., Matthews-Brzozowska T., Wąsik A.*: Wykorzystanie zębów bydlęcych w badaniach stomatologicznych. *Prz. Stomatol. Wiek Rozw.* 1997, 18, 22-26.
19. *Travis D. F., Glimcher M. J.*: The structure and organization of, and the relationship between the organic matrix and the inorganic crystals of embryonic bovine enamel. *J. Cell Biol.* 1964, 23, 447-497.
20. *Walker B. N., Makinson O. F., Peters M. C.*: Enamel cracks. The role of enamel lamellae in caries initiation. *Aust. Dent. J.* 1998, 43, 110-116.
21. *Wąsik A.*: Badania doświadczalne nad szczelnością brzezną materiałów stosowanych jako podkłady izolacyjne. *Czas. Stomatol.* 1975, 28, 601-607.

Adres autora: prof. dr hab. Bogdan Miśkowiak, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań; e-mail: bmiskow@mail.am.poznan.pl