

Erozije humane cakline izazvane kiselim napicima *in vitro*

Erosion of Human Enamel Caused by *in vitro* Acid Beverages

Tonči Staničić
Marijan Tuđa*

Zavod za dentalnu patologiju
Stomatološkog fakulteta
u Zagrebu

* »Pliva« – Kontrola kvalitete
Zagreb

Sažetak

Za istraživanje je korištena caklina 4 humana impaktirana, trajna molara. Od svakog zuba načinjeno je po pet uzoraka prizmatske i besprizmatske cakline. Po jedan uzorak iz svake grupe bio je kontrolni, a ostali su držani u zakiseljenom napitku (»Coca« – pH 2,57) u trajanju od 15, 30, 60 i 120 minuta. Uzorci su zatim priređeni za elektronsku mikroskopiju (SEM) i analizirani. Zapažene su bitne razlike erozijskog djelovanja fosforne kiseline na prizmatsku i besprizmatsku caklinu što se pripisuje morfološkim razlikama. Na humanoj aprizmatskoj površini cakline vidljiv je nepravilan oblik otapanja izražen velikim erozijama grubo hrapavog dna i neravnih rubova neposredno uz područja potpuno netaknute cakline, čak i kod uzoraka najduže izloženosti djelovanju kiseline. Na uzorcima prizmatske caklinske površine prve su promjene vidljive nakon 30 minuta djelovanja kiseline. Najprije se otapaju središta prizama, zatim rubovi prizama (»prizmatska ovojnica«), a kod uzoraka eksponiranih 120 minuta i interprizmatska caklina.

Autori zaključuju da iz rezultata ovog istraživanja proizlazi da na razvoj i napredovanje erozije, osim vrste i pH kiseline, znatan utjecaj imaju i biološke varijacije građe humane cakline.

Ključne riječi: *humana caklina, kiseli napitak, erozija, SEM*

Acta Stomatol. Croat.
1993; 27: 105–111

IZVORNI
ZNANSTVENI RAD

Primljeno: 10. ožujka 1993.

Uvod

Zubna erozija je prema definiciji kemijsko otapanje cakline bez udjela bakterija (1). Epidemiološki podaci o učestalosti erozija variraju od 2 do 25% (1, 2, 3), a kod nekih grupa, kao što su laktovegetarijanci, nađen je čak i viši postotak (4). Ranije klasifikacije zasnivale su se na industrijski uzročenim erozijama koje ni izgledom, ni lokacijom, a niti opsegom ne nalikuju na erozije izazvane napicima i hranom. Zbog toga je Eccles 1979. godine (5) uveo novu kli-

ničku klasifikaciju na osnovi jačine gubitka zubne supstancije (ovisno o tome je li uključena samo caklina ili i dentin) i zahvaćenih površina zuba. Diferencijalno dijagnostički vrlo je teško razlučiti erozije od abrazija i atricija, ali i od razvojnih defekata cakline i dentina. Gubitak zubne supstancije na istim mjestima često može biti prouzročen i kemijskim (erozije) i mehaničkim (abrazije, atricije) čimbenicima (6, 7). Na erozije se često superponira abrazija tako da je nemoguće razaznati jasnu granicu između ta dva stanja.

Uzroci erozija zuba mogu biti vanjski (kisela hrana i napici, kiseline u udišućem zraku) ili unutarnji (regurgitacije povezane s anoreksijom nervosom, hiatus hernijom i sl.) (7). U novije vrijeme uzroci nastanka i razvoja erozija zuba bili su istraživani i in vitro i in vivo, pa nema sumnje da raširena konzumacija kiselih pića, prehrambenih artikala ili medikamenata predstavlja glavni eksterni uzrok erozije (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20). Osobito su klinički slučajevi izoliranih velikih erozija kod omladine bili povezivani s učestalim konzumiranjem zakiseljenih pića. Iz navedenih istraživanja također proizlazi da erozijski učinak može bitno varirati zavisno od pH i kemijskog sastava napitka.

Svrha ovog istraživanja jest da se na humanoj intaktnoj caklini koja do eksperimenta nije bila ni u kakvom dodiru s oralnom sredinom ustanovi djelovanje napitka koji u svom sastavu ima fosforu kiselinu kao bitan sastojak.

Materijali i metode

Za eksperimentalni materijal koristili smo caklinu 4 treća, trajna, impaktirana molara koji do ekstrakcije nisu bili u dodiru s usnom šupljinom. Nakon separacije od korijena dijaman-tnim brusnim tijelom, krune zuba su očišćene od ostataka tkiva rotirajućom četkicom. Zatim su stavljene u 5%-tnu otopinu NaOCl kroz 2 sata i podvrgnute 15 minuta djelovanju ultrazvučnih vibracija kako bi se odstranile sve organske naslage. Nakon dezinfekcije klorheksidin glukonatom i višesatnog ispiranja redestiliranom vodom, načinjeno je od svakog zuba po pet uzoraka srednjeg, prizmatskog dijela cakline (između kuspidalne i cervikalne cakline), dimenzija 3x3 mm i po pet uzoraka cervikalne besprizmatske cakline dimenzija 2x2 mm.

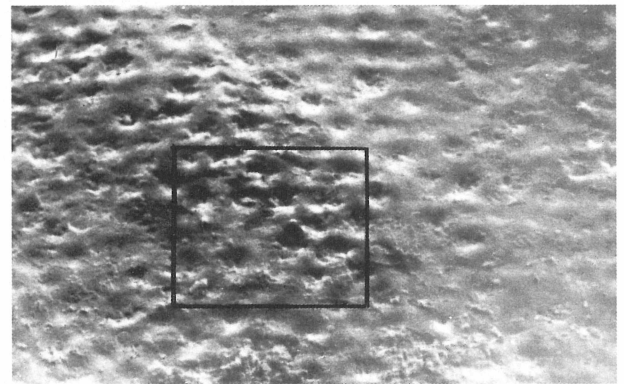
U eksperimentalnom postupku po jedan uzorak srednje i cervikalne cakline svakog zuba ostavljen je u redestiliranoj vodi kao kontrolni uzorak. Ostali uzorci su bili izloženi djelovanju »Cola« napitka u kojem je bitni sastojak fosfora kiselina (pH 2,57). Prvi uzorak bio je potopljen 15 min, drugi 30 min, treći 60 min, a četvrti 120 min. Uzorci su zatim višekратно ispirani u redestiliranoj vodi, te dehidrirani prenošenjem kroz različite koncentracije alkohola sve do apsolutnog alkohola. Nakon toga su napareni u vakuum-aparatu (S 150 Sputter Coater-Ed-

wards) slojem zlata debljine 10–15 nm. Slijedilo je scanning elektronsko mikroskopiranje caklinske površine uzoraka aparatom Stereoscan Cambridge 600 i fotografiranje nalaza.

Rezultati

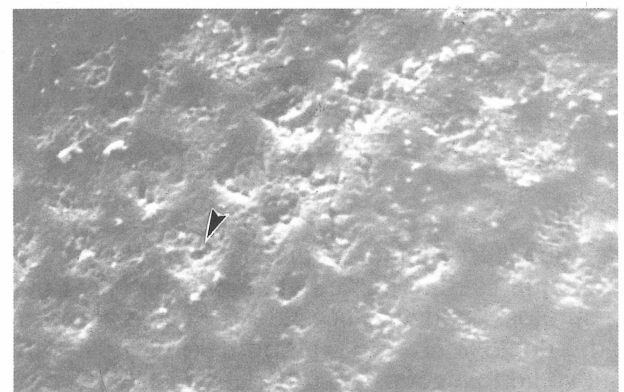
a) Erozije na prizmatskoj caklini

Na uzorcima koji su bili izloženi djelovanju »Cola« napitka 15 minuta nije bilo nikakvih vidljivih promjena u usporedbi s kontrolnim uzorcima cakline. Na površini uzoraka eksponiranih 30 minuta vidjele su se grupe prizama s



Slika 1. Uzorak površine prizmatske cakline nakon 30 min. djelovanja kiseline. Pojačano otapanje središta prizama (x 1000)

Figure 1. Sample of prismatic enamel surface after 30-minute acid exposure. Increased dissolution of prism centres (x 1000)



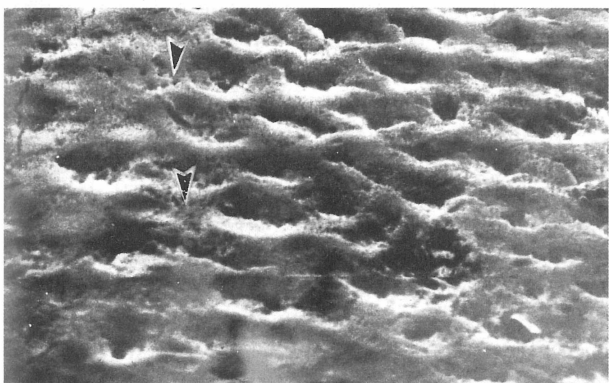
Slika 2. Uvećani detalj sa slike 1. Demineralizacija središta prizama (x 2000)

Figure 2. Enlarged detail from Fig. 1. Demineralisation of prism centres (x 2000)



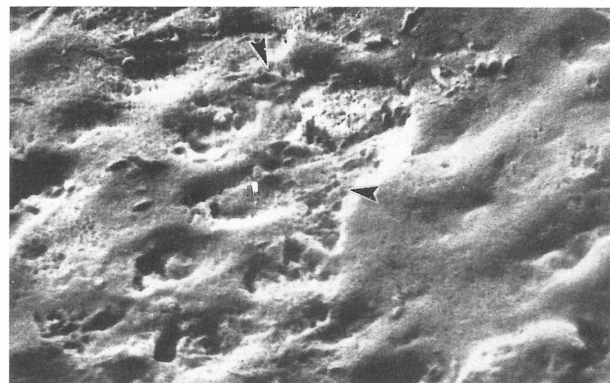
Slika 3. Uzorak površine prizmatске cakline nakon 60 min. eksponiranosti. Rupičasto središte prizama i početno otapanje »prizmatске ovojnice« (strelica) (x 2000)

Figure 3. Samples of prism enamel surface after 60-minute exposure. Perforated prism centre and initial dissolution of prismatic casing (arrow) (x 2000)



Slika 4. Uzorak cakline nakon 120 minuta djelovanja kiseline. Osim otapanja središta i periferije prizama, vidi se i početak otapanja interprizmatске cakline (strelica) (x 2000)

Figure 4. Sample of enamel after 120-minute exposure. Besides the dissolution of the centre and periphery of the prisms, the interprismatic enamel is beginning to dissolve as well (x 2000)



Slika 5. Demineralizirana središta i periferija prizama i interprizmatска caklina nakon 120 minuta eksponiranosti uzorka (x 2000)

Figure 5. Demineralised centres and peripheries of prisms and interprismatic enamel after 120-minute exposure (x 2000)



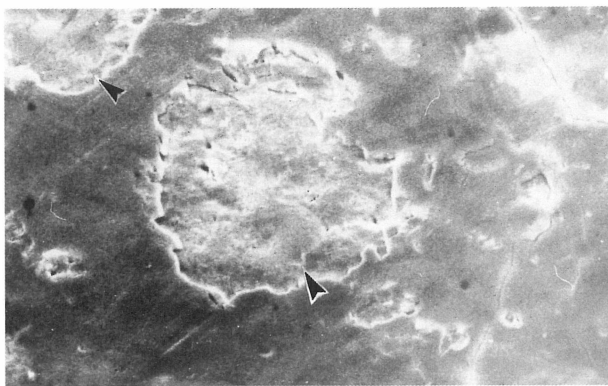
Slika 6. Uzorak besprizmatске cakline nakon 60 min. djelovanja kiseline. Eroziја nepravilna oblika i grubo dna pored gotovo netaknute susjedne cakline (x 2000)

Figure 6. Sample of aprismatic enamel after 60-minute exposure. Erosion of irregular forms and rough bottom close to the intact neighbouring enamel (x 2000)

jače udubljenim i ponegdje rupičastim središtima kao prvi znak demineralizacije. Na uzorcima od 60 minuta središnja su otapanja prizama bila još izraženija, ali su uočene i perforacije na rubovima prizama kao znak početka otapanja tzv. prizmatских ovojnica. Sve navedene promjene, ali još jače izražene, bile su i u grupi uzoraka eksponiranih djelovanju napitka 120 minuta, ali su zapažene i prilično velike površinske erozije na rubovima perikimata.

b) Besprizmatска caklina

Promjene nastale djelovanjem eksperimentalnog napitka na cervikalnoj caklini bitno se razlikuju od navedenih na srednjem dijelu cakline. Uglavnom su na površini cakline vidljive manje ili veće erozije nepravilna oblika i grubo neravna dna, to opsežnije što je vremenski interval djelovanja napitka na površinu ove cakline bio duži. Ove erozije su često bile viđene po-



Slika 7. Uzorak površine besprizmatске cakline nakon 120 minuta eksponiranosti. Multiple erozije površine okružene netaknutom caklinom (x 2000)

Figure 7. Samples of aprismatic enamel surface after 120-minute exposure. Multiple erosion of surface surrounded by intact enamel

red područja potpuno netaknute caklinske površine, čak i kod uzoraka najduže eksponiranosti.

Rasprava

Naš eksperiment je prvo morfološko istraživanje nastajanja i napredovanja erozije u intaktnoj humanoј caklini i promjena površinske ultrastrukture u odnosu na zdravu caklinu kontrolnih uzoraka. Gubitak zubne supstancije nismo kvantificirali mjerenjem kalcija i fosfata. Originalnost našeg pristupa jest u korištenju potpuno intaktne humane cakline impaktiranih zuba koja do eksperimenta nije bila u doticaju s oralnom sredinom. Na taj su se način isključili svi drugi prethodni vanjski utjecaji na površinu cakline, a eksperimentalno stvorene erozivne promjene mogu se pripisati jedino djelovanju fosforne kiseline iz korištenog napitka. Naime, u svim dosadašnjim sličnim istraživanjima korištena je humana caklina zuba predviđenih za ekstrakciju iz ortodontskih ili parodontoloških razloga (10, 19, 20) ili pak animalna caklina (14, 15, 18, 19) koja drukčije reagira na djelovanje kiseline i čak je tri puta topljivija od humane cakline (21). Zbog toga su naši rezultati teško usporedivi s rezultatima navedenih autora, čak i ako se zanemare razlike u građi i kemijskom sastavu svakog pojedinog zuba.

Iz rezultata našeg istraživanja vidljiva je velika razlika između djelovanja zakiseljenog na-

pitka na središnji segment cakline i na cervikalnu, besprizmatску caklinu. Kod prizmatске cakline proces otapanja, u morfološkom smislu, ide određenim redoslijedom prema kojem su najprije zahvaćena središta prizama, zatim periferija prizama, tzv. »prizmatске ovojnice«, da bi kod uzoraka s najdužom ekspozicijom fosfornoj kiseline iz napitka započelo i otapanje interprizmatске cakline. Naprotiv, kod cervikalne cakline, vjerojatno zbog morfoloških razlika u građi karakterističnih za aprizmatску površinu, proces otapanja minerala stvara opsežne površinske erozijske defekte različite veličine i dubine, grubog hrapavog dna i nepravilna oblika. Za erozije ne postoje znanstveni pokazatelji, ali je kod karijesa pokazano da besprizmatска caklina iskazuje iregularan tip otapanja i očigledno se ne otapa na isti način kao prizmatска caklina (22, 23). Eksperimentalni nalaz, da se i na uzorcima najduže izloženosti djelovanju fosforne kiseline mogu pored opsežnih erozija vidjeti područja potpuno intaktne cakline, možemo pripisati činjenici da cervikalni dio cakline ipak nema uvijek i u cijelosti besprizmatску površinu.

Budući da je naš eksperiment izveden in vitro, on ipak ne može vjerno reproducirati situaciju in vivo, jer u ustima djeluju i zaštitni mehanizmi caklinske površine: slina, pelikula i proces remineralizacije. Zbog toga se može pretpostaviti da je početak stvaranja erozijskih lezija in vivo sličan ili identičan ovome izvedenom in vitro, ali značajno usporen zaštitnim mehanizmima.

Klinički je često vrlo teško razlučiti je li gubitak zubne supstancije uzročen erozijom, atricijom ili abrazijom, jer se anamnestički može ustanoviti istovremeno postojanje uzročnika svih triju pojava, a i lokacija im može biti istovjetna. Zato možemo kemijski uzročenu eroziju smatrati inicijalnim načimanjem intaktne caklinske površine na koje se kasnije superponiraju mehanički uzročene atricija i abrazija, povećavajući daljnji gubitak zubne supstancije. Eksperimentalno je dokazan i obrnuti tijek događanja, pri čemu je mehanički abradirana caklina bila mnogo podložnija erozijama (19).

Prema in vitro istraživanjima na bovinoј caklini napredovanje erozijskih lezija iznosi 1,5 do 6 $\mu\text{m/sat}$, a nakon 2 sata proces otapanja cakline postaje linearan (14). Sukladno tome, te bi vrijednosti za humanu caklinu trebale biti otprilike trostruko manje zbog navedene razli-

ke u topljivosti dviju caklina. Velika sličnost izgleda površinske erozijske lezije s najranijim manifestacijama karijesa, tzv. površinskim omekšanjem, upućuje na sličan ili isti mehanizam nastajanja. Razlike nastupaju vjerojatno u kasnijim stadijima razaranja cakline kada se kod karijesa oblikuje površinska zona, a glavna demineralizacije seli u potpovršinsko područje, dok se kod erozija zbog stalnog procesa samočišćenja i čišćenja površine, a time i aktiviranja abrazije, proces demineralizacije širi linearno u dubinu. Zašto je to tako, teško je objasniti samo činjenicom da kod karijesa postoji na caklini trajna naslaga plaka kao izvora kiseline, a kod erozije kiseline dopijevaju na zub povremeno aerosolima, hranom i napicima. Mnogo vjerodostojnije objašnjenje pruža Larsen u svojim istraživanjima (24, 25, 26, 20). Ustanovljeno je da površinska erozija cakline nastaje kada je vodena faza (kiselina + slobodni ioni) podzasićena u odnosu prema fluorapatitu i hidroksilapatitu. Kada je pak vodena faza podzasićena prema hidroksilapatitu, a prezasićena prema fluorapatitu, tada nastaje lezija nalik na karijes s potpovršinskom demineralizacijskom zonom prekrivenom prilično dobro mineraliziranim površinskim slojem. Demineralizacijski sustav u kojem se vodena faza stalno obnavljala prije negoli je postignuto zasićenje naspram fluorapatita stvarao je lezije nalik na erozije, čak i u prisutnosti fluorida u vodenoj fazi.

Razmatrajući uzroke erozija cakline, nesumnjivo je da važnu ulogu ima kemijski sastav i pH napitka. Dokazano je da je kemijski sastav napitka bitan jer različite kiseline (fosforna, jabučna, limunska) imaju različiti demineralizirajući učinak (11, 12, 14, 15, 16, 17, 19), ali da su od utjecaja i drugi sastojci. Tako npr. kiseli mliječni proizvodi ne djeluju erozivno zbog visokog sadržaja kalcija i fosfata (8, 13, 16).

Erozijski učinak izgleda da je obrnuto proporcionalan pH vrijednostima; niži pH napitka, veći kapacitet otapanja apatita (17). Napitak koji smo mi upotrijebili (»Cola«), osim šećera i

različitih drugih ingredijenata, sadrži i fosfornu kiselinu s pH 2,57 koji je dosta niži od kritičnog pH za caklinu od 5,5 s kojim započinje proces demineralizacije. Ono što je još važnije, ova fosforna kiselina je nezasićena naspram kalcijevog hidroksilapatita i fluorapatita. Za erozijsku djelotvornost nekog napitka važna je i ukupna količina kiseline otopljene u nekom napitku, tj. titar kiseline (16, 19). Erozivno djelovanje nekog kiselog napitka značajno ovisi i o učestalosti pijenja tog napitka. Zakiseljeni napici nisu toliko štetni ako se uzimaju normalno, a ne kontinuirano i u kratkim vremenskim razmacima. Međutim, potencijalno jako erozivni mogu biti za pacijente s poremećajima u salivaciji (11). Prema istraživanjima Meurmana i sur. (13), nakon pijenja kiselih napitaka pH vrijednosti na površini jezika vraćaju se na normalu već nakon nekoliko minuta, a za »Cola« napitke to iznosi 2–3 minute. Ali, piju li se ti napici kontinuirano, onda su ti vremenski intervali duži, pa je i caklina duže s njima u dodiru.

Kao olakšavajuću okolnost treba spomenuti da kiseli napici stimuliraju jače lučenje sline, a to mijenja i puferski kapacitet kiseline u napitku. Dodavanje slini fluorida izgleda da ne djeluje na smanjenje erozija i ne prevenira demineralizaciju ili je reparira remineralizacijom kao u slučaju karijesne demineralizacije (15, 19).

Zaključak

Zaključno treba reći da iz rezultata našeg istraživanja postaje očigledno da je pored kiselinskog sadržaja i pH vrijednosti potencijalno erozivnog napitka značajna i građa cakline pri kemijskim promjenama njezine površinske ultrastrukture i napredovanju erozije. Te biološke varijacije građe cakline izgleda da su od primarne važnosti i da ih treba uzeti u obzir u istraživanjima svih vrsta razaranja cakline, a ne samo kod onih povezanih s nastankom erozija.

EROSION OF HUMAN ENAMEL CAUSED BY IN VITRO ACID BEVERAGES

Adresa za korespondenciju:
Address for correspondence:

Summary

The enamel of four human impacted permanent molar teeth was used in the study. Five samples of prismatic and aprismatic enamel were made for each tooth. One sample from each group served as control, while the others were kept in the acidulated beverage (»Cola«-pH 2.57) for 15, 30, 60 and 120 minutes. Samples were then prepared for electronic microscopy (SEM) and analysed. Essential differences were noticed in the erosive effect of the phosphoric acid on the prismatic and aprismatic enamel, which is attributed to morphological differences. An irregular form of dissolution was noticed on the aprismatic surface of the enamel, expressed by extensive erosions of the rough bottom and irregular margins close to the intact enamel, even in samples with the longest exposure to acid. On samples of prismatic enamel surfaces the first changes occurred 30 minutes after the acid exposure. The first to dissolve are the centres of prisms, followed by prism margins and in samples with 120-minute exposure even the interprismatic enamel.

Key words: *human enamel, acid beverage, erosion, SEM*

Dr. Tonči Staničić
Zavod za dentalnu patologiju
Stomatološki fakultet
Gundulićeva 5
Zagreb, Hrvatska

Literatura

- PINDBORG J J. Pathology of dental hard tissues. Munksgaard, Copenhagen 1970.
- XHONGA F A, VALDMANIS S. Geographic comparisons of the incidence of dental erosion: A two-centre study. *J Oral Rehabil* 1983; 10:269-277.
- XHONGA F A, VALDMANIS S. Factor analysis of dental erosion occurrence. *J Oral Rehabil* 1986; 13:247-256.
- LINKOSALO E, MARKKANEN H. Dental erosions in relation to lactovegetarian diet. *Scand J Dent Res* 1985; 93:436-441.
- ECCLES J D. Dental erosion of nonindustrial origin. A clinical survey and classification. *J Prosthet Dent* 1979; 42:649-653.
- FRANK R M, HAAG R, HEMMERLE J. Rôle des facteurs mécaniques dans le développement des lacunes cunéiformes cervicales. *Rev Mens Suisse Odontostomatol* 1989; 99:521-529.
- JŠRVINEN V, RYTMAA I, MEURMAN J H. Location of dental erosion in a referred population. *Caries Res* 1992; 26:391-396.
- BIBBY B G, MUNDORFF S A. Enamel demineralization by snack foods. *J Dent Res* 1975; 54:461-470.
- DAVIS W B, WINTER P J. Dietary erosion of adult dentine and enamel. *Brit Dent J* 1977; 143:116-119.
- REUSSNER G H, COCCODRILLI G, THIESSEN R. Effects of phosphates in acid-containing beverages on human tooth erosion. *J Dent Res* 1975; 54:365-370.
- TENUOVO J, REKOLA M. Some effects of sugar-flavored acid beverages on the biochemistry of human whole saliva and dental plaque. *Acta odontol Scand* 1977; 35:317-330.
- HOLLOVAY P J, MELLANBY M, STEWART R J C. Fruit drinks and tooth erosion. *Brit Dent J* 1985; 104:305-309.
- MEURMAN J H, RYTMAA I, KARI K. Salivary pH and glucose after consuming various beverages, including sugar-containing drinks. *Caries Res* 1987; 21:353-359.
- RYTMAA I, MEURMAN J H, KOSKINEN J. In vitro erosion of bovine enamel caused by acidic drinks and other foodstuffs. *Scand J Dent Res* 1988; 96:324-333.

15. SORVARI R, KIVIRANTA I, LUOMA H. Erosive effect of a sport drink mixture with and without addition of fluoride and magnesium on the molar teeth of rats. *Scand J Dent Res* 1988; 96:226-231.
16. GROBLER T H, SENEKAL P J C, KOTZE T J V W. The degree of enamel erosion by five different kind of fruit. *Clin Prev Dent* 1989; 11:23-28.
17. MEURMAN J H, SVERI H. Experimental sports drinks with minimal dental erosion effect. *Scand J Dent Res* 1990; 98:120-128.
18. MEURMAN J H, FRANK R M. Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res* 1991; 25:1-6.
19. MEURMAN J H, FRANK R M. Progression and surface ultrastructure of in vitro caused erosive lesions in human and bovine enamel. *Caries Res* 1991; 25:81-87.
20. LARSEN M J. On the chemical and physical nature of erosion and caries lesions in dental enamel. *Caries Res* 1991; 25:323-329.
21. FEATHERSTONE J D B, MELLBERG J R. Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. *Caries Res* 1981; 15:109-114.
22. HAIKEL Y, FRANK R M. Microscopie électronique à balayage de la surface d'émail aprismatique normal et carie de dents temporaires humaines. *J Biol Buccale* 1982; 10:111-124.
23. HAIKEL Y, FRANK R M. Scanning electron microscopy of the human enamel surface layer of incipient carious lesions. *Caries Res* 1983; 17:1-13.
24. LARSEN M J. Demineralization of dental enamel. *Scand J Dent Res* 1974; 82:491-495.
25. LARSEN M J. An investigation of the theoretical background for the stability of the calcium phosphate salts and their mutual conversion in aqueous solutions. *Archs Oral Biol* 1986; 31:757-761.
26. LARSEN M J, JENSEN S J. The hydroxyapatite solubility product of human dental enamel as a function of pH in the range 4.6-7.6 at 20°C. *Arch Oral Biol* 1989; 34:957-961.