

Utjecaj salivarne pelikule na nastanak erozije cakline *in vitro*

Effect of Salivary Pellicle on the Occurrence of Enamel Erosion *in vitro*

Tonči Staničić
Marijan Tuđa*

Zavod za dentalnu patologiju
Stomatološkog fakulteta u
Zagrebu
* »Pliva« – Kontrola kvalitete

Sažetak

Naše istraživanje je usporedna morfološka studija ultrastrukturnih promjena površine cakline s pelikulom i bez nje. U istraživanju je korištena prizmatska caklina triju humanih impaktiranih molara. Od svakog zuba načinjeno je po 10 uzoraka. Po pet uzoraka svakog zuba stavljeno je na 2 sata u nefrakcioniranu, humanu, parafinskim voskom stimuliranu slinu uzetu od jednog davaoca kako bi se na caklinskoj površini istaložila pelikula. Po dva uzorka svakog zuba, jedan s pelikulom a drugi bez nje, bili su kontrolni, a ostali su stavljeni u zakiseljeni napitak (»Cola« – pH 2,57) u vremenu od 15, 30, 60 i 120 minuta. Uzorci su zatim priređeni za elektronsku mikroskopiju (SEM) i analizirani. Kontrolni uzorci su pokazali da je pelikula nehomogena, »krapasta«, i da ne pokriva potpuno caklinsku površinu. Usporedbom nalaza na caklini s pelikulom i onoj bez nje, općenito se može potvrditi da su erozijske promjene bile znatno manje izražene kod uzoraka s pelikulom bez obzira na vrijeme provedeno u zakiseljenom napitku. Uzorci cakline bez pelikule već su nakon 30 minuta eksponiranosti fosfornoj kiselini pokazivali demineralizacijske promjene središta prizama, a u intervalima od 60 i 120 minuta i periferije prizama i interprizmatske cakline. Kod uzoraka s pelikulom na površini demineralizacijske promjene su viđene samo nakon najdužeg vremena izlaganja kiselini. Slabija otapanja vidljiva su samo u središtu prizama, a na pojedinim uzorcima uočena je i blaga demineralizacija periferije. Dobiveni rezultati potvrđuju hipotezu da salivarna pelikula može zaštititi caklinu od erozijskog djelovanja zakiseljenih napitaka.

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

Acta Stomatol. Croat.
1993; 27: 187–192

IZVORNI
ZNASTVENI RAD

Primljeno: 15. travnja 1993.

Uvod

U patologiji tvrdih zubnih tkiva erozije zauzimaju važno mjesto, a njihova se incidencija vidno povećala zadnjih desetljeća. Brojna istraživanja in vivo i in vitro upućuju da je tome glavni razlog promijenjeni režim prehrane koji uključuje vrlo rasprostranjeno i povećano konzumiranje zakiseljenih napitaka, hrane i medikamentata (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). Eksperimentalno proizvedene erozije in vitro ipak ne mogu vjerno reproducirati situaciju in vivo. U ustima djeluju i zaštitni mehanizmi caklinske površine: slina, pelikula i proces remineralizacije koji mogu znatno utjecati na opseg i brzinu razaranja zubnih struktura. Pretpostavlja se da je slina ključni čimbenik obrane domaćina i u slučajevima erozija, a ne samo karijesa (11, 12, 13, 14). Kod većine ljudi normalni salivarni protok i funkcija mogu objasniti zašto klinički slučajevi erozije nisu i mnogo češći, usprkos jako povećanoj konzumaciji zakiseljenih napitaka i hrane.

Svrha je ovog rada istražiti učinak eksperimentalne salivarne pelikule na stvaranje erozije cakline korištenjem in vitro modela humanog zuba.

Materijali i postupci

Kao eksperimentalni materijal upotrijebili smo caklinu 3 treća, trajna, impaktirana molara koji do ekstrakcije nisu bili u dodiru s usnom šupljinom. Nakon odvajanja korijena dijamantrnim brusnim tijelom, krune zuba su rotirajućom četkicom očišćene od ostataka tkiva. Zatim su stavljene u 5%-tnu otopinu NaOCl tijekom 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 10 uzoraka srednjeg, prizmatskog dijela cakline (između kuspide i cervikne cakline), dimenzija 3 x 2 mm. Po osam uzoraka svakog zuba korišteno je u eksperimentalnom postupku. Dva uzorka cakline svakog zuba, jedan bez pelikule a drugi s pelikulom, bili su kontrolni. Kontrolni uzorak cakline s pelikulom nije stavljen u kiseli napitak, nego je odmah dehidriran, naparen zlatom i analiziran pod elektronskim mikrosko-

pom kako bi se potvrdilo stvaranje ove naslage na površini cakline.

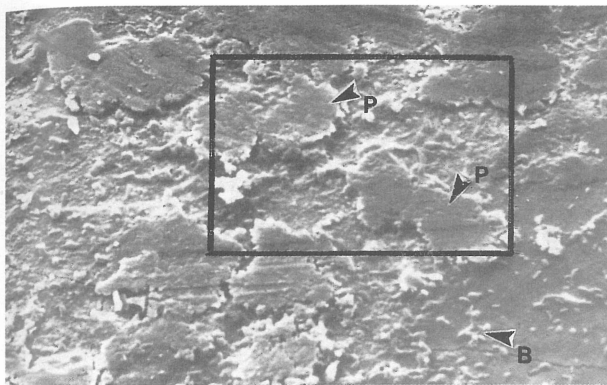
U sterilne bočice prikupljeno je od jednog davaoca oko 80 ml parafinskim voskom stimulirane sline koja je potom držana na stalnoj temperaturi od 37°C. Po četiri uzorka cakline svakog zuba stavljena su u slinu koja je mijenjana svakih 30 minuta tijekom 2 sata, uz stalno protresanje bočica kako bi se na površini uzoraka odložila pelikula. Druga četiri caklinska uzorka ostavljena su u redestiliranoj vodi do početka erozijskog eksperimenta. Nakon toga su svi uzorci bili izloženi djelovanju »Cola« napitka u kojem je bitni sastojak fosforna kiselina (pH 2,57). Prva dva uzorka (s pelikulom i bez nje) provela su u zakiseljenom napitku 15 minuta, druga dva 30 minuta, treća dva 60 minuta, a četvrta dva 120 minuta. Napitak u kojem su bili uzorci stalno smo mijenjali kako bismo spriječili promjenu pH, do koje može doći zbog razlaganja kiseline u dodiru s kristalima hidroksiapata.

Uzorci su zatim 20 minuta čišćeni od organskih naslaga u 5%-tnom NaOCl, višekratno 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-Edwards) slojem zlata debljine 10–15 nm. Slijedilo je scanning elektronsko mikroskopiranje (SEM) caklinske površine uzoraka aparatom Stereoscan Cambridge 600 i fotografiranje nalaza.

Rezultati

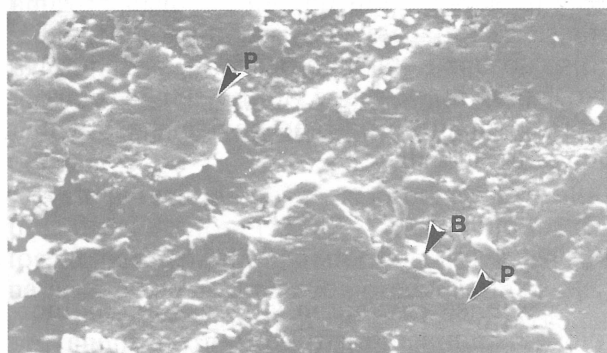
Kontrolni uzorci

Površina kontrolnih uzoraka cakline bez pelikule pokazivala je normalan izgled netaknute cakline s izraženim perikimatama, caklinskim kopicama i razvojnim defektima u obličju malih fisurica i jamica. Na kontrolnim uzorcima s istaloženom pelikulom opisani izgled caklinske površine bio je uglavnom nevidljiv, jer ga je prekrila naslaga. Sama pelikula nije bila homogeni sloj, nego u obliku krpica gustog organskog materijala raspršenih po površini cakline. Također je bilo vidljivo i dosta pojedinačnih bakterija, jer slina nakon prikupljanja nije bila sterilizirana.



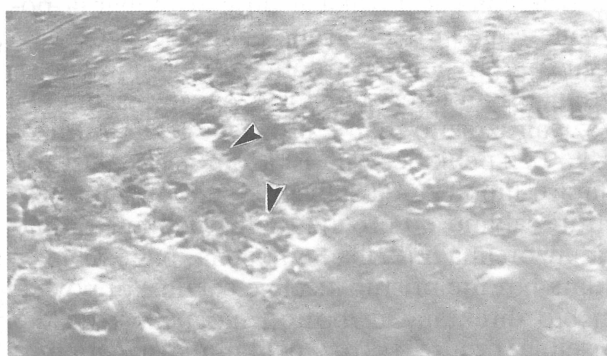
Slika 1. Salivarna pelikula na površini cakline. Strelicama označene »krpice« organske supstancije (P) i bakterije (B) (x 1000)

Figure 1. Salivary pellicle on the enamel surface. Arrows indicate organic substance »patches« (P) and bacteria (B) (x 1000)



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

Figure 2. A magnified detail from Figure 1 (x 2000)



Slika 3. Erozijske promjene na površini cakline s pelikulom nakon 60 minuta djelovanja kiseline. Strelicama označena demineralizirana središta pojedinih prizama (x 1000)

Figure 3. Erosive alterations on the enamel surface with pellicle after a 60-min acid action. Arrows indicate demineralized centers of particular prisms. (x 1000)



Slika 4. Demineralizacija središta pojedinačnih prizama na uzorku s pelikulom nakon 60 minuta ekspozicije (x 2000)

Figure 4. Demineralized centers of particular prisms in the specimen with pellicle after 60 min of exposure (x 2000)



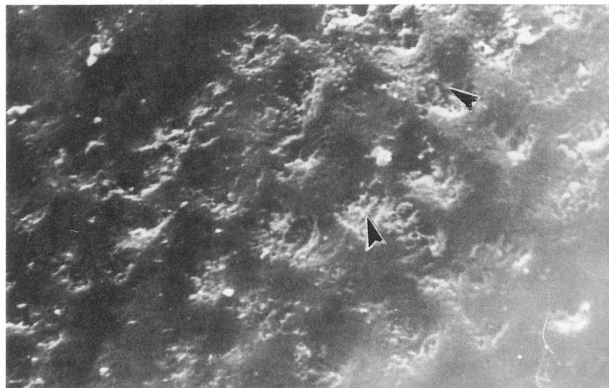
Slika 5. Demineralizacija središta i periferije prizama na uzorku s pelikulom nakon 120 minuta (x 2000)

Figure 5. Demineralization of prism centers and periphery in the specimen with pellicle after 120 min. (x 2000)

Eksperimentalni uzorci cakline bez pelikule

Prve erozijske promjene u ovoj grupi uzoraka zamijećene su nakon 30 minuta izloženosti djelovanju napitka. Očitovale su se laganim produbljivanjem središta prizama i stvaranjem malih šupljina. Nakon 60 minuta djelovanja fosforne kiseline iz napitka zapažene su demineralizacijske promjene i na rubovima caklin-skih prizama u području tzv. »prizmatske ovojnice«. U grupi najduže eksponiranih uzoraka (120 min) erozijsko otapanje je najjače izraženo, a vidljiv je i početak otapanja interprizmat-

ske cakline i izraženiji erozijski defekti na rubovima perikimata nepravilna oblika i grubo zrnata dna.

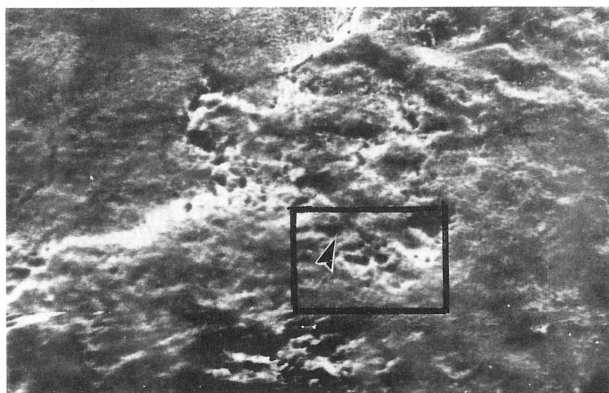


Slika 6. Izraženija otapanja središta grupice prizama na uzorku nakon 120 minuta djelovanja kiseline (x 2000)

Figure 6. Pronounced dissolutions of the centers of a small group of prisms in the specimen after 120 min of acid action (x 2000)

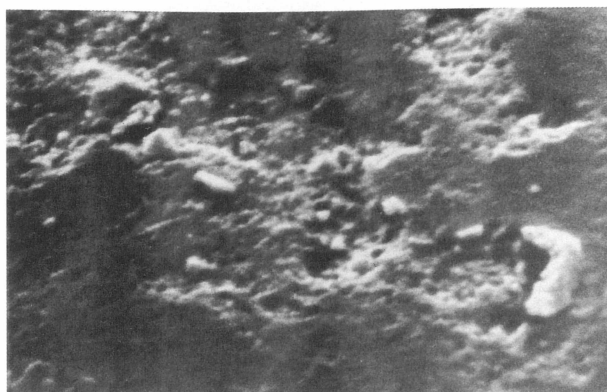
Ekperimentalni uzorci cakline s pelikulom

Općenito je moguće potvrditi da je caklina uzoraka s pelikulom bila manje kemijski oštećena od one bez pelikule. Vrlo male promjene površinske građe u obliku blage šupljikavosti središta pojedinih prizama bile su vidljive tek nakon 60 minuta djelovanja zakiseljenog napit-



Slika 7. Erozijska površina na rubu perikimate kod uzorka s pelikulom nakon 120 minuta djelovanja kiseline (x 2000)

Figure 7. Erosive surface on the margin of the perikymata in the specimen with pellicle after 120 min. (x 2000)



Slika 8. Uvećani detalj sa slike 7 (x 4000)

Figure 8. A magnified detail from Figure 7 (x 4000)

ka. U grupi uzoraka koji su bili eksponirani djelovanju napitka 120 minuta, središta prizama bila su nešto jače demineralizirana, a sporadično su uočena i otapanja periferije prizama. Na dva uzorka iz ove grupe vidljive su i na rubu perikimata manje erodirane površine nepravilna oblika i gruba dna.

Rasprava

Naše je istraživanje in vitro usporedna morfološka studija ultrastrukturnih promjena površine nezaštićene i pelikulom zaštićene cakline, izazvanih djelovanjem fosforne kiseline iz »Cola« napitka (pH 2,57). Iz dobivenih rezultata očigledna je razlika u opsegu otapanja površine između dvije grupe uzoraka. Uzorci cakline prekriveni salivarnom pelikulom u svim su vremenskim intervalima izloženosti kiselinu pokazivali izrazito manje erozijske lezije od uzoraka bez pelikule. Tim iskazom naši nalazi podupiru hipotezu da salivarna pelikula može zaštititi caklinu od erozija. Sama pelikula na našim uzorcima nije bila homogena, pa je na mjestima bez nje pristup kiseline caklinskoj površini bio direktan, ali postoji mogućnost da dio kiseline prodre i kroz pelikulu. Ta činjenica objašnjava erozijske promjene i na ovim uzorcima, iako manje izražene nego na uzorcima bez pelikule. Našim istraživanjem ipak nije bilo moguće utvrditi koliki dio kiseline pelikula može zadržati. Ovaj »krpasti« izgled pelikule naših kontrolnih uzoraka možda je uzrokovan i preparacijskim oštećenjima kod dehidracije uzoraka i sl.

Premda istraživanja *in vitro* nisu u stanju potpuno imitirati prilike *in vivo*, rezultate ovakvih istraživanja ipak treba uzimati donekle kritično. Naime, ni jednu patološku promjenu cakline ne izaziva *in vivo* samo jedan čimbenik, a ni zaštitni mehanizam nije jednodimenzionalan. Obično se radi o istovremenom djelovanju više uzročnika i njihovim interakcijama, a u mehanizmu zaštite vrlo blisko i udruženo mogu sudjelovati i slina i pelikula i rekristalizacijsko-remineralizacijski procesi. Također treba imati na umu da u *in vivo* okolnostima svi ti čimbenici napada i obrane caklinske površine u svojim vrijednostima neprestano variraju. U eksperimentalnom modelu oslonili smo se na tri konstante: 1. intaktna caklina impaktiranih molara koja nije bila prethodno u dodiru s usnom šupljinom, pa sve nastale promjene možemo pripisati jedino djelovanju eksperimentalnog napitka; 2. poznati i stalni pH kiseline, koji se naprotiv u ustima može mijenjati zbog stalnog protoka sline; 3. pelikula koja je odložena tijekom 2 sata, dok se u ustima kontinuirano odvija proces obaranja salivarnih proteina na caklinsku površinu.

Naše je rezultate teško uspoređivati s rezultatima drugih autora (11, 12, 13, 14) zbog različitog eksperimentalnog materijala (bovina caklina ili humana caklina zuba predviđenih za ekstrakciju iz ortodontskih razloga) ili proizvođenja salivarne pelikule na drugi način. U istraživanjima navedenih autora korištena je izbistrena i centrifugirana slina, kakva prirodno ne postoji, a uzorci cakline u njoj su proveli vrijeme od 2–7 dana, a u tolikom vremenskom intervalu obično se *in vivo* na površini zuba formiraju i pelikula i plak. Mi smo se za stvaranje pelikule koristili nefrakcioniranom, ukupnom stimulira-

nom slinom i uzorke držali u njoj 2 sata, kako su preporučili i znanstveno verificirali Sonju i sur. (15) i Tinanoff i sur. (16). Centrifugiranjem i pročišćivanjem u znatnoj se mjeri iz sline odstranjuju mucini koji imaju važnu ulogu u zaštiti cakline od djelovanja kiselina (17, 18). Istraživanja demineralizacijskog procesa povezanog sa zubnim karijesom pokazala su pak da salivarni proteini koji pokrivaju površinu cakline smanjuju otapanje apatita (17, 18, 19, 20). Na temelju tih nalaza, sugeriramo da se slično djelovanje pelikule može zapaziti i u odnosu na erozijske lezije. Međutim, moramo još više znati o protektivnim mehanizmima i njihovoj funkciji kod inicijalne erozijske lezije, tj. je li pelikula samo mehanička barijera kiselinama ili djeluje i nekim drugim mehanizmima. Iz istraživanja karijesa, koje su proveli navedeni autori, poznato je da pelikula djeluje zaštitno mehaničkim ograničavanjem kinetike procesa demineralizacije, zatim mijenjanjem električnog naboja caklinske površine, čime se onemogućuje prodor iona suprotnog naboja u caklinu, ali i selektivnom ionskom propusnošću kojom neke ione propušta, a drugima priječi prodor prema caklini ili iz nje. Zasad nema saznanja o tome ponaša li se pelikula na isti ili sličan način i kod stvaranja erozija.

Zaključak

Iz rezultata našeg istraživanja očigledna je zaštitna uloga pelikule kod nastajanja erozija cakline, iako nam nije poznat i mehanizam kojim sprečava ili umanjuje djelovanje kiseline na površini cakline.

EFFECT OF SALIVARY PELLICLE ON THE OCCURRENCE OF ENAMEL EROSION IN VITRO

Adresa za korespondenciju:
Address for correspondence:

Summary

A comparative morphologic study of ultrastructural changes of enamel surface with and without pellicle was performed using enamel prisms of three human impacted molars. Ten specimens were prepared for each tooth. Five specimens of each tooth were immersed into nonfractionated paraffin-wax-stimulated saliva obtained from a donor for 2 h, to allow the pellicle to precipitate over the enamel surface. Two specimens of each tooth, one with and another without the pellicle, served as controls, whereas other specimens were placed in an acidified beverage (Cola, pH 2.57) for 15, 30, 60 and 120 min. Then, the specimens were prepared for electron microscopy (SEM) and analyzed. Control specimens showed the pellicle to be inhomogeneous, »patchy« and failing to cover the entire enamel surface. Comparison of the findings on the enamel with and without pellicle generally confirmed the erosion alterations to be significantly less pronounced in the specimens with pellicle, regardless of the time they were left in acidified beverage. The enamel specimens without pellicle showed demineralizing changes of the prism centers as early as after 30 min of exposure to phosphoric acid, and changes of the prism periphery and interprism enamel after 60 and 120 min, respectively. In the specimens with pellicle on the surface, demineralizing alterations were only observed after the longest period of acid exposure. Minor dissolutions were observed in prism centers only, with mild demineralization of the prism periphery in some of them. The results obtained supported the hypothesis that salivary pellicle could protect the enamel from the erosive action of acidified beverages.

Key words: *human enamel, pellicle, acidified beverage, SEM*

Dr. Tonči Staničić
Zavod za dentalnu patologiju
Stomatološki fakultet
Gundulićeva 5
41000 Zagreb, Hrvatska

Literatura

1. XHONGA F A, VALDMANIS S. Factor analysis of dental erosion occurrence. *J Oral Rehabil* 1986; 13: 247-256.
2. LINKOSALO E, MARKKANEN H. Dental erosions in relation to lactovegetarian diet. *Scand J Dent Res* 1985; 93:436-441.
3. BIBBY B G, MUNDORFF S A. Enamel demineralization by snack foods. *J Dent Res* 1975; 54:461-470.
4. DAVIS W B, WINTER P J. Dietary erosion of adult dentine and enamel. *Brit Dent J* 1977; 143:116-119.
5. HOLLOVAY P J, MELLANBY M, STEWART R J C. Fruit drinks and tooth erosion. *Brit Dent J* 1985; 104:305-309.
6. RYTÖMAA 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.
7. SORVARI R, KIVIRANTA I, LUOMA H. Erosive effect of 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.

8. 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.
9. MEURMAN J H, HÖRKÖNEN M, NÖVERI H. Experimental sports drinks with minimal dental erosion effect. *Scand J Dent Res* 1990; 98:120-128.
10. 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.
11. MANNENBERG F. Saliva factors in cases of erosion. *Odontol Revy* 1963; 14:156-166.
12. MEURMAN J H, RYTÖMAA I, KARI K. Salivary pH and glucose after consuming various beverages, including sugar-containing drinks. *Caries Res* 1987; 21:353-359.
13. MEURMAN J H. Symposium: dental erosion. *J Dent Res* 1989; 68 (Suppl.):20.
14. MEURMAN J H, FRANK R M. Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res* 1991; 25:1-6.21.
15. SONJU T, CHRISTENSEN T B, KORNSTAD L. Electron microscopy, carbohydrate analysis and biological activities of the proteins adsorbed in two hours to tooth surfaces in vivo. *Caries Res* 1974; 8:113-122.
16. TINANOFF N, GLICK P L, WEBER D F. Ultrastructure of organic films on the enamel surface. *Caries Res* 1976; 10:19-32.
17. ZAHRADNIK R T, PROPAS D, MORENO E C. Effect of salivary pellicle formation time on in vitro attachment and demineralization by streptococcus mutans. *J Dent Res* 1978; 57:1036-1042.
18. VISSINK A, GRAVEMMADE E J, GELHARD T B F M. Rehardening properties of mucin or CMC-containing saliva substitutes on softened human enamel. *Caries Res* 1985; 19:212-218.
19. MORENO E C, ZAHRADNIK R T. Demineralization and remineralization of dental enamel. *J Dent Res* 1979; 58:896-903.
20. NIEUW-AMERONGEN A V, ODERKERK C H, DRIESSENS A A. Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. *Caries Res* 1987; 21:297-309.