

## PROMJENE U MIKROTVRDOĆI ČAKLINE KOD RAZVOJA POČETNE KARIJESNE LEZIJE

**Tonči Staničić, Krešimir Novosel\***

Zavod za dentalnu patologiju Stomatološkog fakulteta u Zagrebu

\* Zavod za materijale Strojarskog fakulteta u Zagrebu

Primljeno: 20. 3. 1988.

### Sažetak

Da bi se istražio početak razvoja karijesnog razaranja cakline za potrebe eksperimentalnog postupka in vivo korištena je intaktna caklina 18 impaktiranih trećih trajnih donjih molara koji do ekstrakcije nisu bili u kontaktu s oralnim karijesogenim faktorima. Po četiri uzorka cakline svakog zuba ugrađena su u parcijalne proteze dobrovoljaca, a peti uzorak istog zuba je poslužio kao kontrolni. Uzorci su boravili u ustima 7, 14, 21 i 28 dana. Nakon vađenja iz proteza, uzorci su očišćeni od organskih naslaga, uloženi u epoksi smolu i ispolirani dijamantnim prahom. Za procjenu opsega djelovanja demineralizacijskih i remineralizacijskih procesa u toku razvoja početnog karijesa primjenjena je metoda mjerenja mikrotvrdoće po Vickersu na poprečnim presjecima uzoraka. Prvi rezultati promjena mikrotvrdoće uočeni su tek kod uzoraka koji su boravili u ustima 21 dan i to u prvih 30  $\mu\text{m}$  od vanjske površine cakline. To ne znači da proces demineralizacije ne postoji i u manje eksponiranim uzorcima, nego da ova evaluacijska metoda nije toliko precizna da ga u toj fazi razvoja karijesa registrira. Jača demineralizacija je registrirana do dubine od oko 60  $\mu\text{m}$  kod uzoraka oralno eksponiranih 28 dana. Kod četiri uzorka ove posljednje grupe je u površinskih 30  $\mu\text{m}$  zabilježen porast vrijednosti mikrotvrdoće, što bi govorilo za pojavu procesa remineralizacije, ali taj porast nije dosegao vrijednosti mikrotvrdoće kod originalne intaktne cakline kontrolnog uzorka dotičnog zuba.

**Ključne riječi:** mikrotvrdoća, caklina, karijes

### UVOD

Procesi demineralizacije i remineralizacije su glavna obilježja nastanka i razvoja karijesnog razaranja cakline. Njihovo neprestano izmjenjivanje koje započinje već u momentu erupcije zuba daje karijesu intermitentan karakter, a prevladavanje jednog ili drugog procesa dovodi ili do zaustavljanja razaranja ili do trajnog gubitka caklinske supstancije. Za bilježenje

i kvantificiranje ovih promjena korištene su ili posebno razvijene brojne tehnike, a jedna od njih je i mjerenje mikrotvrdoće. Kompariranjem rezultata mjerenja na zdravoj i karijesnoj caklini dolazimo na posredan način do saznanja o opsegu djelovanja procesa demineralizacije i remineralizacije. Metoda je dosta korištena i samostalno i u kombinaciji s drugim metodama (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8). Postoje dva načina korištenja ove metode. Prvi je da mjerimo promjene mikrotvrdoće na samoj površini karijesom omekšane cakline ili u samim ustima, što omogućuje stvaranje longitudinalnih studija, ili pak na ekstrahiranim zubima kod istraživanja *in vitro* (8, 9, 10). Prednost ovog načina je i da je neinvazivan, pa stoga naročito pogodan za *in vivo* istraživanja. Međutim, za dobivanje podataka o promjenama mikrotvrdoće u dubljim slojevima cakline je ovaj način nepogodan, pa se koristi mjerenje na poprečnom rezu cakline.

Cilj ovog istraživanja je da se na intaktnom caklinskom materijalu eksponiranom *in vivo* oralnim karijesogenim faktorima ustanove sami počeci karijesnog razaranja, a koji prethode i dovode do formiranja inicijalne karijesne lezije tzv. »bijeje mrlje«. Ujedno bi to trebalo biti i provjera mjerenja mikrotvrdoće kao evaluacijske metode za određivanje postojanja demineralizacijskih i remineralizacijskih procesa u caklini, njene primjenjivosti i valjanosti procjene ovih najranijih oblika manifestiranja karijesa.

## MATERIJALI I METODE

Bukalna caklina 18 impaktiranih trećih trajnih donjih molara koja nije bila u kontaktu s oralnom sredinom očišćena je rotirajućom četkicom i potapanjem u 5<sup>0/0</sup>-tni NaOCl 2 sata i 15-minutno izlaganje ultrazvučnim vibracijama od organskih naslaga. Nakon dezinfekcije Hibitanom i dilutnim alkoholom i višesatnog ispiranja u redestiliranoj vodi caklinska ploha je izrezana dijamantnim brusnim tijelom na pet segmenata širine oko 2 mm. Jedan uzorak je pohranjen u redestiliranoj vodi kako bi poslužio kao kontrolna grupa kod mjerenja, a ostala četiri su aplicirana u produžna sedla parcijalnih proteza dobrovoljaca kojima je objašnjena svrha i cilj istraživanja. Zamoljeni su da se pridržavaju svog uobičajenog režima prehrane, da barem jednom dnevno pojedju ili popiju nešto slatko i da dio proteze s caklinskim uzorcima ne četkaju nego samo isperu laganim mlazom vode kako ne bi odstranili organske naslage pelikule i plaka. Svakih 7 dana vađen je iz proteze po jedan uzorak, pa je tako prvi uzorak cakline bio izložen karijesogenim faktorima usne šupljine 7 dana, drugi 14, treći 21 i četvrti 28 dana. Uzorci su zatim stavljeni na 20 minuta u 5<sup>0/0</sup>-tni NaOCl da bi se odstranilo organske naslage i dehidrirani prevođenjem kroz različite koncentracije alkohola sve do apsolutnog. Potom su uzorci uloženi u epoksi smolu u položaju koji je ostavljao vidljivim poprečni presjek cakline od površine prema CDS-u. Uzorci su nakon toga zajedno s epoksi nosačem brušeni dijamantnim prahom u uljnoj emulziji da bi se dobila planparalelna površina. Na takvim uzorcima je mjerena mikrotvrdoća površine poprečnog presjeka cakline.

Korišten je metal-mikroskop »Reichert-MeF« s prigradenim mikrotvrdo-mjerom s  $F_{\max.} = 100 \times 9,81 \text{ N}$ . Upotrebljena je metoda određivanja mikrotvrdoće po Vickersu izražena s HV 0,1.

$$\text{HV } 0,1 = \frac{K \times F}{d^2}$$

$K$  — konstanta = 1.8544  
 $F$  — sila  
 $d$  — dijagonala otiska

Sila se izražava u pondima, a dijagonala otiska u  $\mu\text{m}$ . Određenom silom materijal — uzorak se pritišće na dijamantnu piramidu uređaja, pa se nakon toga mjeri u mikrometrima veličina otiska koju piramida ostavlja u uzorku, tj. dijagonala otiska. Iz gornje formule se zatim izračunava HV 0,1.

## REZULTATI

Zbog izrazite specifičnosti građe i kemijskog sastava zubne cakline od jedne do druge individue, pa čak i od jednog do drugog zuba iste osobe, dobiveni rezultati iz mjerenja mikrotvrdoće poprečnog presjeka cakline pokazivali su veliku varijabilnost. Zato su se komparacije vrijednosti mjerenja mogle vršiti jedino među uzorcima istog zuba, odnosno između kontrolnog uzorka i četiri oralno eksponirana uzorka. Na tablicama I i II prikazani su rezultati mjerenja mikrotvrdoće za dvije reprezentativne grupe

HV 0,1

dubina u $\mu\text{m}$	kontrolni	7 dana	14 dana	21 dana	28 dana
30	155	150	145	120	<u>135</u>
60	150	150	150	135	130
90	155	155	155	145	145
120	155	155	155	155	155
150	150	155	160	155	155
180	150	155	160	155	155
210	150	155	155	150	150

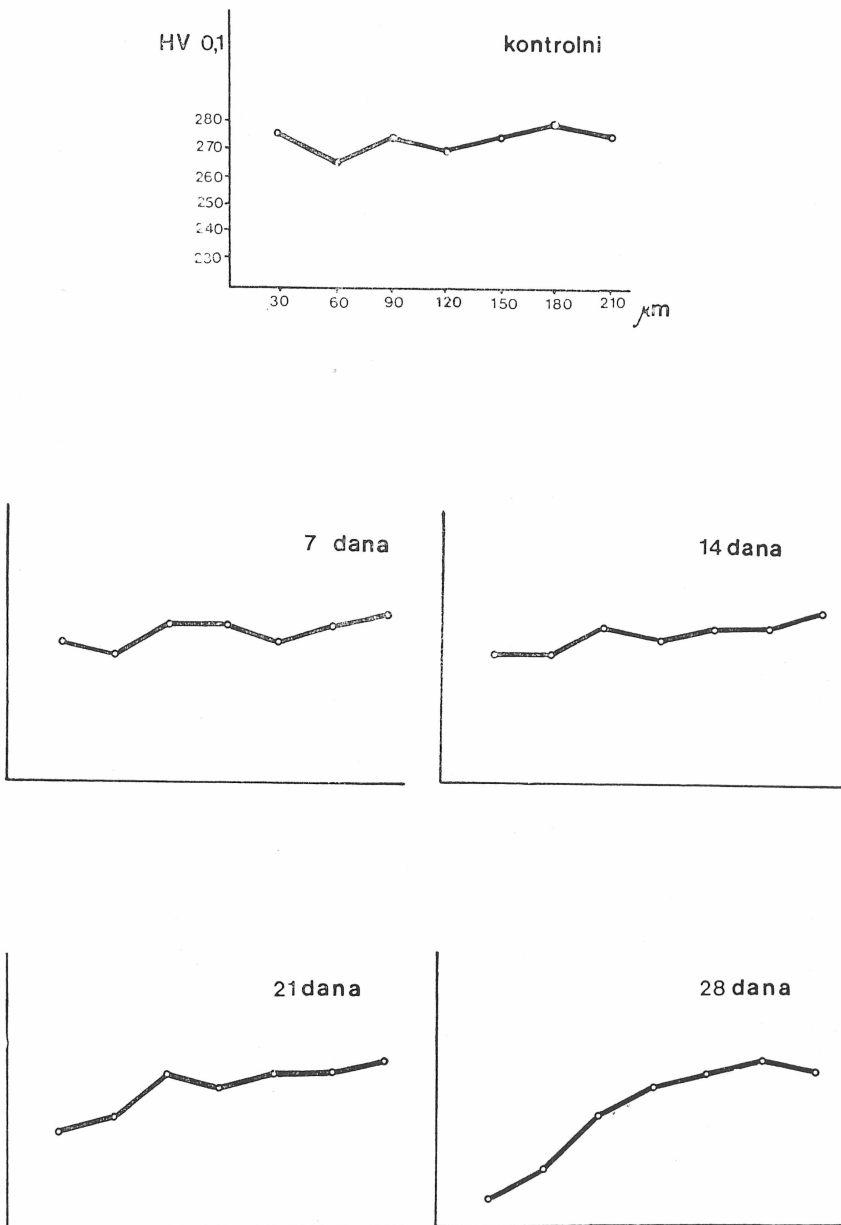
Tablica 1. Vrijednosti testa mikrotvrdoće za zub br. 8.

## HV 0,1

dubina u $\mu\text{m}$	kontrolni	7 dana	14 dana	21 dana	28 dana
30	275	270	265	255	230
60	265	265	265	260	240
90	275	275	275	275	260
120	270	275	270	270	270
150	275	270	275	275	275
180	280	275	275	275	280
210	275	280	280	280	275

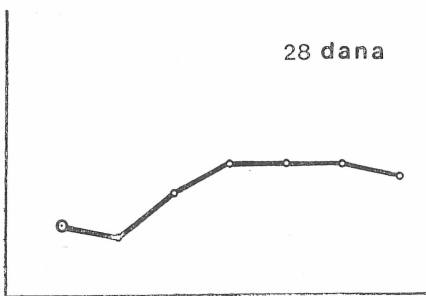
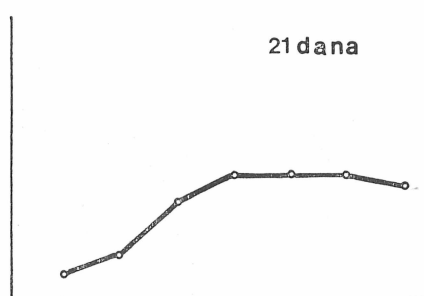
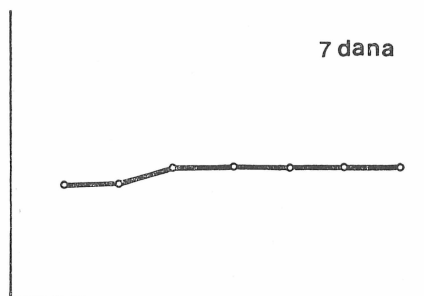
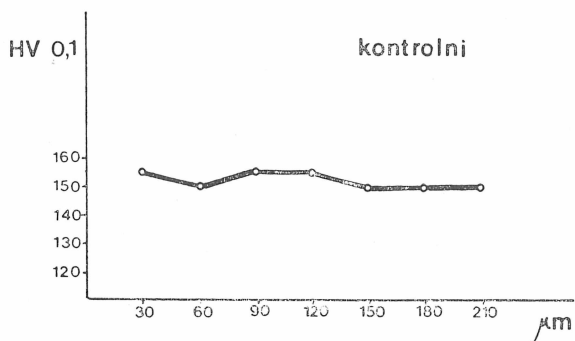
Tablic 2. Vrijednosti testa mikrotvrdoće za zub br. 11.

uzoraka izvrnutih in vivo karijesogenim faktorima, odnosno promjene mikrotvrdoće kod dva zuba. Zbog bolje preglednosti iste vrijednosti su prenesene na Grafikone I i II. Mjerenja vrijednosti mikrotvrdoće vršena su u razmacima od oko 30  $\mu\text{m}$  od vanjske površine cakline prema CDS-u. Početne vrijednosti mikrotvrdoće kod kontrolnih uzoraka na udaljenosti od 30  $\mu\text{m}$  od vanjske površine kretale su se od jednog do drugog zuba u rasponu za HV 0,1 od 142 do 275. To govori o postojanju velikih razlika u mikrotvrdoći originalne intaktne cakline od zuba do zuba. Mjerenja na kontrolnim uzorcima dala su na svakom od njih posebno niz približno jednakih vrijednosti mikrotvrdoće koje kada se prenesu na grafikon daju liniju gotovo ujednačenog toka. Na uzorcima izloženim djelovanju oralne sredine 7 i 14 dana nisu zapažene nikakve izraženije promjene u mikrotvrdoći cakline. Od ukupnog broja uzoraka oralno eksponiranih 21 dan kod dva je zapaženo blago sniženje tvrdoće u prvih površinskih 30  $\mu\text{m}$ . Kod uzoraka eksponiranih 28 dana tri su uzorka pokazivala sasvim mali pad vrijednosti mikrotvrdoće u površinskih 60  $\mu\text{m}$ , sedam uzoraka nije pokazivalo nikakav bitniji pad vrijednosti u površinskijim dijelovima cakline, a četiri uzorka su pokazivala značajniji pad vrijednosti u najpovršinskijem sloju, da bi zatim tvrdoća postupno rasla do dubine od 90  $\mu\text{m}$  i dalje imala standardne vrijednosti. Vrlo zanimljiv rezultat su pokazala četiri uzorka ove grupe eksponiranosti, od kojih je jedan primjer pokazan na Tablici II. Kod njih je zapažena blaga tendencija porasta vrijednosti za HV 0,1 mikrotvrdoće u površinskih 30  $\mu\text{m}$ , a dalje je prema dubini krivulja vrijednosti imala isti tok kao i kod ostalih uzoraka ove grupe, tj. sniženje



Grafikon 1. Grafički prikaz rezultata mikrotvrdoće s Tablice 2.

zub br. 11



Grafikon 2. Grafički prikaz rezultata mikrotvrdoće s Tablice 2.

mikrotvrdoće do dubine od 60  $\mu\text{m}$ , a dalje rast prema standardnim vrijednostima na 90  $\mu\text{m}$  dubine od vanjske površine cakline.

## RASPRAVA

Analiza rezultata dobivenih mjerenjem mikrotvrdoće caklinskih uzoraka na poprečnom rezu je pokazala da je ova evaluacijska metoda pogodna za primjenu i kod najranijih manifestacija karijesnog razaranja cakline. Iz dobivenih rezultata je vidljivo da je caklina zuba vrlo brzo nakon izlaganja oralnim faktorima karijesnog djelovanja izložena jakim demineralizacijskim procesima koji se u kraćim ili duljim vremenskim intervalima izmjenjuju s periodima remineralizacije. Te promjene cakline nisu odmah vidljive golim okom, a u momentu kada ih registriamo u obliku »bijeje mrlje« onda je to već vrlo opsežno i poodmaklo karijesno razaranja cakline.

Određene teškoće kod ove vrste mjerenja dolaze od samog uređaja koji je konstruiran za mjerenje mikrotvrdoće metala, a caklina ima dosta nehomogenu strukturu, dijelom i zbog prisustva organske komponente. Također, problem predstavlja i translucenčnost cakline, pa se zbog male kontrastnosti teško uočava otisak koji u njoj ostavlja dijamantna prizma. Zbog opasnosti od loma ne smije se mjeriti neposredno uz površinski rub cakline, pa smo mjerenja obavili na udaljenosti od 30  $\mu\text{m}$  od vanjske površine. Te i slične probleme su uočili i drugi autori, ali je ipak preporučuju kao vrijednu komparativnu metodu za registraciju demineralizacije i remineralizacije cakline (2, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 13). Mikrotvrdoća je, inače, linearna funkcija lokalnog sadržaja minerala, ali ne znamo šta kvantitativno znače promjene u smislu gubljenja minerala. Vrijednosti mikrotvrdoće, mjerene penetracijom dijamantnog tijela, su mjere mehaničke rezilijencije cakline. Pad vrijednosti mikrotvrdoće se u određenoj mjeri ne podudara sa stvarnim gubitkom minerala i zbog specifičnog načina tog gubljenja iz cakline u početnom stadiju razvoja karijesne lezije. Minerali se uglavnom gube najprije iz centra apatitnih kristala, pa caklina i uz gubitak mineralnog sastava do 38% može dugo zadržati svoj integritet. Toj činjenici se mogu pridružiti i naši rezultati iz kojih je vidljivo da se osjetniji pad mikrotvrdoće bilježi tek kod uzoraka koji su u ustima proveli 28 dana, ali i kod njih se odnosi samo na najpovršinskiji dio cakline. Blagi porast vrijednosti mikrotvrdoće, iako nije dosegao vrijednost originalne intaktne cakline, a koji smo našli kod četiri uzorka 28-dnevne oralne ekspozicije, pripisali smo posljedicama djelovanja procesa remineralizacije.

### ALTERATIONS IN ENAMEL MICROHARDNESS IN INITIAL CARIOUS LESIONS

#### Summary

Intact enamel of 18 permanent impacted third lower molars that had not come into contact with oral cariogenic factors prior to extraction,

was used to study the initial development of carious enamel destruction in an *in vivo* experiment. Four specimens of each tooth enamel were inserted into the volunteers' partial prostheses, whereas the fifth specimen served as a control. The specimens were left in the volunteers' mouths for 7, 14, 21 or 28 days. After removing them out the prostheses, the specimens were cleaned from organic deposits, embedded into epoxy resin and polished with diamond powder. The measurement of microhardness along the specimen cross-sections according to Vicekrs was employed to assess the extent of the processes of demineralization and remineralization during the development of initial caries. The first results pointing to changes in microhardness were obtained only in the specimens that were left in mouths for 21 days, involving the first 30  $\mu\text{m}$  of the enamel surface. This did not exclude the process of demineralization as being also present in the specimens orally exposed during a shorter period of time, but showed the method of evaluation chosen to be inadequately precise to record it at this stage of the development of caries. Stronger demineralization was recorded to the depth of 60  $\mu\text{m}$  in the specimens orally exposed during 28 days. In four specimens from the latter group, the value of microhardness was observed to increase in the superficial 30  $\mu\text{m}$ , which would indicate the process of remineralization, but this increase did not reach the values of microhardness of the original intact enamel of the respective tooth control samples.

**Key words:** Microhardness, enamel, caries.

#### Literatura

1. DAVIDSON CL, HOEKSTRA IJ, ARENDS J. Microhardness of sound, decalcified and etched tooth enamel related to calcium content. *Caries Res* 1974; 8:135—144.
2. PURDELL-LEWIS DJ, GROENEVELD A, ARENDS J. Hardness tests on sound enamel and artificially demineralized white spot lesions. *Caries Res* 1976; 10:201—215.
3. BOSCH JJ ten, BORSBOOM PCF, CATE JM ten. A nondestructive method for monitoring de- and remineralization of enamel. *Caries Res* 1980; 14:90—95.
4. ARENDS J, SCHUTHOF J, JONGEBLOED WL. Lesion depth and microhardness indentations on artificial white spot lesions. *Caries Res* 1980; 14:190—195.
5. CATE JM ten, DUIJSTERS PPE. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res* 1982; 16:201—210.
6. FEATHERSTONE JDB, CATE JM ten, SHARIATI M, ARENDS J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res* 1983; 17:385—391.
7. CROONENBURG EJ van, WOLTGENS JHM, QUA CJ, BLIECK-HOGERVORST JMA de. Hardness changes and mineral loss in enamel during the intraoral cariogenicity test in the presence of 0.125% EHDP with or without 0.1% F<sup>-</sup>. *J Biol Buccale* 1986; 14:231—234.
8. FOSSE G, ROSENGREN B, SKAAL E, LEKNES K WULFF L. An *in vivo* method for microhardness measurements on human teeth. *Scand J Dent Res* 1986; 94:27—37.
9. CALDWELL RC, MUNTZ ML, GILMORE RW, PIGMAN W. Microhardness studies of intact surface enamel. *J Dent Res* 1957; 6:327—341.
10. ARENDS J, SCHUTHOF J, JONGEBLOED WG. Microhardness indentations on artificial white spot lesions. *Caries Res* 1979; 13:290—287.
11. BUSKES JAKM, CHRISTOFFERSEN J, ARENDS J. Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions. *Caries Res* 1985; 19:490—496.



12. HERKSTRÖTER FM, ARENDS J. Plaque-induced mineral loss of human enamel monitored by longitudinal micro-radiography. *Caries Res* 1988; 22:125 (Abs N° 125).
13. RENTSCH H, ZSCHAN HE, VOGT J, OTTO G. Chemical changes in the outermost bovine enamel layer during white-spot lesion formation. *Caries Res* 1988; 22:102 (Abs N° 41).