Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta

UDK 636.09:611.314.018:57.086.2/.3(043.3)

Nina Mlakar, dr. vet. med.

MIKROSKOPSKA IN SPEKTROSKOPSKA OCENA STRUKTURIRANOSTI DENTINA RAZLIČNIH ŽIVALSKIH VRST

Doktorska disertacija

MICROSCOPIC AND SPECTROSCOPIC EVALUATION OF DENTIN STRUCTURE IN DIFFERENT ANIMAL SPECIES

Doctoral thesis

Ljubljana, 2014

Nina Mlakar

MIKROSKOPSKA IN SPEKTROSKOPSKA OCENA STRUKTURIRANOSTI DENTINA RAZLIČNIH ŽIVALSKIH VRST

Delo je bilo opravljeno na:

- Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete v Ljubljani
- Inštitutu za anatomijo, histologijo in embriologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani
- Kliniki za reprodukcijo in konje Veterinarske fakultete v Ljubljani
- Odseku za fiziko trdne snovi Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani
- Katedri za inženirske materiale, Oddelku za metale in metalurgijo Naravoslovnotehniške fakultete v Ljubljani

Javni zagovor je bil opravljen v Ljubljani, dne _____

Mentor: prof. dr. Zlatko Pavlica, dr. vet. med.
Somentor: prof. dr. Milan Petelin, dr. stom.

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Gregor Fazarinc, dr. vet. med.
Član: prof. dr. Janez Štrancar,
Član: doc. dr. Zoran Arsov
Član: doc. dr. Rok Gašperšič, dr. stom.

“Destiny is not a matter of chance; it is a matter of choice. It is not a thing to be waited for, it is a thing to be achieved.”

(William Jennings Bryan)

IZVLEČEK

Ključne besede: Veterinarska medicina; dentin – ultrastruktura; kristalografija; hidroksiapatiti – analize – fiziologija; mikroskopija; mikroskopija, fluorescenčna; mikroskopija, elektronska, vrstična; elektronska, spinska, resonanca, spektroskopija

Dentin oblikuje osnovo zoba. Perforiran je z dentinskimi kanali (DK), obdanimi s plaščem peritubularnega dentina (PTD), obe strukturi pa obdaja intertubularni dentin (ITD). Glavni organski gradnik dentina je kolagen, anorganski pa hidroksiapatitni (HA) kristal. Kolagena vlakna dentina v veliki meri potekajo vzporedno z vzdolžno osjo zoba. V isti smeri je urejen tudi majhen delež HA kristalov, ki se najverjetneje nahaja intrafibrilarno. Intrafibrilarni kristali zvišajo trdoto, tlačno trdnost in togost mineraliziranega tkiva. Zato se pojavi vprašanje, če se delež urejenih HA kristalov odraža v mehanskih lastnostih zob. Vzorce dentina psa, prašiča, konja, krokodila in človeka smo opazovali s svetlobnim, fluorescenčnim in vrstičnim elektronskim mikroskopom ter elektronsko paramagnetno resonanco. Ugotovili smo, da DK v vratnem delu korenine preiskovanih vrst potekajo proti vertikalni osi skozi središče zobne pulpe pod ostrim kotom, spremenljivost naklona DK v tem delu dentina pa je zelo majhna. Glede na število in premer DK, širino in površino PTD ter površino ITD sta si bila najbolj podobna dentin človeka in prašiča, najbolj pa je, predvsem zaradi števila DK, izstopal dentin krokodila. V dentinu vseh vrst smo dokazali kotno odvisnost signala elektronske paramagnetne resonance (EPR). Potrdili smo, da so *c*-osi HA kristalov preferenčno urejene vzdolž vertikalne osi skozi središče zobne pulpe. S simulacijami spektrov EPR smo ugotovili, da ima dentin krokodila največji delež urejenih kristalov, sledi mu dentin psa, prašiča in konja, najnižji delež urejenih kristalov pa ima dentin človeka. Dokazali smo, da je v vratnem delu koreninskega dentina vseh preiskovanih vrst majhen delež HA kristalov urejen, večji del pa je naključno razporejen. Iz dobljenih rezultatov in podatkov iz literature sklepamo, da delež preferenčno urejenih HA kristalov v dentinu korelira z jakostjo griznih sil pri različnih vrstah živali. Višji delež urejenih kristalov namreč pozitivno korelira z boljšimi mehanskimi lastnostmi dentina.

ABSTRACT

Key words: Veterinary medicine; dentin – ultrastructure; crystallography; hydroxyapatites – analysis – physiology; microscopy; microscopy, fluorescence; microscopy, electron, scanning; electron spin resonance spectroscopy

Dentin forms the bulk of the tooth. Through the thickness, dentin is perforated by numerous dentinal tubules (DK) embedded in a collar of peritubular dentin (PTD). Both structures are surrounded by intertubular dentin (ITD). Main organic compound of dentin is collagen and main inorganic compound is hydroxyapatite (HA) crystal. Collagen fibrils lie predominantly parallel to the long axis of the tooth and a small amount of HA crystals is arranged in the same direction. These crystals are presumably positioned between collagen fibrils and they enhance hardness, compressive strength and stiffness of mineralized tissue. The question is raised as to whether preferentially oriented mineral concentration reflects in mechanical properties of teeth. Canine, porcine, equine, crocodile and human dentinal samples were investigated by light, fluorescent and scanning electron microscopy and by electron paramagnetic resonance. In the cervical part of a tooth root, DK ran almost perpendicularl to the vertical axis through the pulp. Variability of DK inclination was minimal. Human dentin shared most similarities to porcine dentin with no significant differences found in DK diameter, density of DK, PTD thickness and PTD or ITD surface area. The most evident difference was large number of DK in crocodile dentin. In dentin of all species, an angular dependence of electron paramagnetic resonance (EPR) signal was demonstrated. *C*-axes of HA crystals were oriented parallely to the vertical axis through the pulp. Simulations of EPR spectra revealed that crocodile dentin has the largest fraction of oriented crystals. Further on, fractions decreased from canine, porcine to equine dentin. The lowest fraction of oriented HA crystals was observed in human dentin. Present study on dentinal samples derived from cervical part of the tooth root confirmed that only minor fraction of HA crystals in dentin has a preferred orientation, while most of crystals are randomly oriented. Based on the results of the present study and literature data, we suggest that fraction of preferentially oriented HA crystals in dentin could relate to the biting forces in different animal species. Higher proportion of oriented crystals positively correlates with better mechanical properties of dentin.

KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK 5
ABSTRACT 6
KAZALO VSEBINE 7
KAZALO SLIK 10
INDEX OF FIGURES 11
KAZALO TABEL 12
INDEX OF TABLES 12
SEZNAM OKRAJŠAV 13

1. UVOD 15
1.1 Namen in hipoteze 16

2. PREGLED LITERATURE 17
1.2 Zobje in grizne sile 17
2.2 Organska strukturiranost dentina 18
2.2.1 Odontoblasti in njihova diferenciacija 19
2.2.2 Organski del dentina 21
2.2.2.1 Kolagen 22
2.2.2.2 Nekolagene matriksne beljakovine 23
2.3 Dentinogeneza 24
2.3.1 Dentinski kanali 24
2.3.2 Peritubularni dentin 26
2.3.3 Intertubularni dentin 27
2.3.4 Oblikovanje dentina okrog pulpine votline 28
2.3.4.1 Plaščni dentin 28
2.3.4.2 Primarni in sekundarni dentin 29
2.3.4.3 Terciarni dentin 30
2.3.4.4 Transparentni dentin 30
2.4 Hidroksiapatitni kristal kot anorganski del dentina 31

3. MATERIAL IN METODE 34
3.1 Vzorci dentina 34
3.1.1 Priprava vzorcev dentina za svetlobno mikroskopijo 35
3.1.2 Priprava vzorcev dentina za vrstično elektronsko mikroskopijo 35
3.1.3 Priprava vzorcev dentina za fluorescenčno mikroskopijo in elektronsko paramagnetno resonanco 37
3.2 Priprava liposomov 37
3.3 Svetlobna mikroskopija: potek in naklon dentinskih kanalov glede na vertikalno os skozi središče zobne pulpe (α) 38
3.4 Fluorescenčna mikroskopija: spremenljivost naklona dentinskih kanalov z razdaljo od pulpinega kanala (δ_φ) 39
3.5 Vrstična elektronska mikroskopija: mikrostrukturiranost dentina 40
3.6 Merjenje spektrov elektronske paramagnetne resonance 42
3.7 Računalniško modeliranje spektrov elektronske paramagnetne resonance 43
3.7.1 Prostorska porazdelitev smeri hidroksiapatitnih kristalov 44
3.7.1.1 Model 1: Diskretna porazdelitev hidroksiapatitnih kristalov pod kotom glede na lokalno smer dentinskih kanalov 44
3.7.1.2 Model 2: Zvezna porazdelitev hidroksiapatitnih kristalov v ravnini dentinski kanali- pulpa 45
3.7.1.3 Model 3: Zvezna porazdelitev hidroksiapatitnih kristalov vzdolž pulpe 45
3.7.2 Izračun spektrov elektronske paramagnetne resonance 45
3.7.3 Primerjanje izračunanih spektrov z izmerjenimi 46
3.7.4 Filtriranje rezultatov 46
3.8 Statistično vrednotenje rezultatov 47
3.8.1 Svetlobna mikroskopija 47
3.8.2 Vrstična elektronska mikroskopija 47

4. REZULTATI 48
4.1 Svetlobna mikroskopija: potek ter naklon dentinskih kanalov glede na pulpin kanal (α) 48

4.2 Fluorescenčna mikroskopija: spremenljivost naklona dentinskih kanalov z razdaljo od pulpinega kanala (δ_φ) 50
4.3 Vrstična elektronska mikroskopija: mikrostrukturiranost dentina 51
4.4 Elektronska paramagnetna resonanca 54
4.4.1 Vrednosti Zeemanovega sklopitvenega tenzorja ter analiza oblike spektra elektronske paramagnetne resonance 54
4.4.2 Simulacije spektrov elektronske paramagnetne resonance 56

5. RAZPRAVA 59
5.1 Naklon dentinskih kanalov glede na vertikalno os skozi središče zobne pulpe 59
5.2 Usmerjenost preferenčno urejenih hidroksiapatitnih kristalov v koreninskem delu dentina ter njihova kvantifikacija 60
5.3 Vpliv urejenosti hidroksiapatitnih kristalov na mehanske lastnosti dentina 65
5.4 Delež urejenih hidroksiapatitnih kristalov kot možen kazalec jakosti griznih sil ter korelacija deleža z debelino sklenine 66
5.5 Mikrostrukturiranost dentina 68

6. ZAKLJUČKI 71

7. POVZETEK 72

8. SUMMARY 74

9. ZAHVALA 76

10. LITERATURA 78

11. PRILOGE 91
11.1 Odločba za izjemno uporabo živalskih stranskih proizvodov kategorije 1 (zob evtanaziranih psov) 91
11.2 Odločba za izjemno uporabo živalskih stranskih proizvodov kategorije 3 (zob prašičev in kopitarjev) 93
11.3 Izvozno in uvozno dovoljenje za zobe krokodila 95

KAZALO SLIK

Slika 1: Makroskopska in mikroskopska strukturiranost zoba in dentina 19

Slika 2: Krokodilji zobje, uporabljeni v raziskavi..... 34

Slika 3: Človeški sekalec in na njem označeno mesto izreza vzorca dentina..... 36

Slika 4: Shematski prikaz merjenja kotov φ, ki jih dentinski kanali oklepajo glede na Z os vzorca dentina 40

Slika 5: Dentinski kanal s pripadajočim peritubularnim dentinom v dentinu prašiča in dentinu konja 42

Slika 6: Merjenje naklona dentinskih kanalov glede na vertikalno os skozi središče zobne pulpe..... 48

Slika 7: Naklon dentinskih kanalov (α) živalskih vrst in človeka glede na vertikalno os skozi središče zobne pulpe..... 49

Slika 8: Spremenljivost naklona dentinskih kanalov z oddaljenostjo od pulpinega kanala 50

Slika 9: Posnetki prečnih prerezov vzorcev dentina psa, prašiča, konja, krokodila in človeka 52

Slika 10: Posneti spektri elektronske paramagnetne resonance v odvisnosti od lege vzorca glede na magnetno polje..... 55

Slika 11: Primerjava izmerjenih in izračunanih spektrov elektronske paramagnetne resonance kotnih odvisnosti postavitve vzorca dentina 56

Slika 12: Ujemanje izračunanih in izmerjenih spektrov elektronske paramagnetne resonance 57

Slika 13: Delež preferenčno urejenih hidroksiapatitnih kristalov (d_z)..... 58

Slika 14: Shematski prikaz prečno prerezanega sekalca z označenim mestom odvzema vzorca dentina in urejenost hidroksiapatitnih kristalov 62

INDEX OF FIGURES

Figure 1: Macroscopic and microscopic structure of tooth and dentin 19

Figure 2: Crocodile teeth used in the study 34

Figure 3: A rectangle on a human incisor tooth indicates the area where the dentinal sample was obtained from 36

Figure 4: Measurements of the dentinal tubule tilt angles φ towards Z axis of the dentinal sample 40

Figure 5: Dentinal tubule with peritubular dentin in porcine and equine dentin 42

Figure 6: Measurement of tilt angles of dentinal tubules relative to the vertical axis of the dental pulp 48

Figure 7: Tilt angles of dentinal tubules (α) relative to the vertical axis of the dental pulp in animals and human 49

Figure 8: Alternation of dentinal tubule tilt angle with the distance from the root canal 50

Figure 9: Scanning electron microscopy images of cross sections of dentinal samples from a dog, pig, horse, crocodile and human 52

Figure 10: Recorded electron paramagnetic resonance spectra relative to position of a dentinal sample towards the magnetic field 55

Figure 11: Comparison of measured and calculated electron paramagnetic resonance spectra relative to position of dentinal sample 56

Figure 12: Calculated and measured electron paramagnetic resonance spectra fitting .. 57

Figure 13: Proportion of preferentially oriented hydroxyapatite crystals (d_z) 58

Figure 14: Schematic presentation of a transverse section through an incisor tooth root with a rectangle indicating the dentinal sample and arrows indicating the arrangement of hydroxyapatite crystals 62

KAZALO TABEL

Tabela 1: Podatki o vzorcih dentina, vključenih v raziskavo 35

Tabela 2: Mikrostrukturne karakteristike dentina psa, prašiča, konja, krokodila in človeka 53

INDEX OF TABLES

Table 1: Data on the dentinal samples used in the study 35

Table 2: Microstructural characteristics of canine, porcine, equine, crocodile and human dentin 53

SEZNAM OKRAJŠAV

a	parameter stopnje urejenosti hidroksiapatitnih kristalov
B_0	srednja vrednost magnetnega polja
BM	bazalna membrana
B_{res}	resonančno magnetno polje
Ca^{2+}	kalcijev ion
CO_2^-	karbonatni radikal
CO_3^{2-}	karbonatni ion
CO_3^{3-}	karbonatni radikal
Co^{60}	radioaktivni izotop kobalta
CSM	cementno-skleninska meja
CV	koeficient variacije
DCM	dentinsko-cementna meja
DK	dentinski kanal
DSM	dentinsko-skleninska meja
d_z	delež hidroksiapatitnih kristalov, urejenih vzdolž Z-osi
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EDXS	energijska disperzijska spektrometrija (angl. *energy dispersive X-ray spectroscopy*)
EM	elektronska mikroskopija
EPR	elektronska paramagnetna resonanca
FM	fluorescenčna mikroskopija
g_0	Zeemanov sklopitveni faktor za prosti elektron
$g_\perp$	pravokotna komponenta aksialno simetričnega Zeemanovega sklopitvenega tenzorja
g_{II}	vzporedna komponenta aksialno simetričnega Zeemanovega sklopitvenega tenzorja
HA	hidroksiapatit
HE	barvilo hematoksilin in eozin
ITD	intertubularni dentin

OH^-	hidroksidni ion
OKF	oktakalcijev fosfat
PBS	fosfatni pufer (angl. *phosphate buffer saline*)
p_{DK}	ploščina dentinskih kanalov
p_{DK+PTD}	ploščina dentinskih kanalov s peritubularnim dentinom
$p_{DK+PTD\ (k)}$	ploščina dentinskih kanalov s peritubularnim dentinom pri konju
p_{ITD}	ploščina intertubularnega dentina
PO_4^{3-}	fosfatni ion
p_{PTD}	ploščina peritubularnega dentina
$p_{PTD\ (k)}$	ploščina peritubularnega dentina pri konju
PTD	peritubularni dentin
r_{DK}	polmer dentinskih kanalov
R_{DK}	premer dentinskih kanalov
r_{DK+PTD}	polmer dentinskih kanalov s peritubularnim dentinom
R_{DK+PTD}	premer dentinskih kanalov in peritubularnim dentinom
SD	standardna deviacija
$y^{(exp)}$	kvadrat odstopanja izmerjenega signala elektronske paramagnetne resonance
$y^{(sim)}$	kvadrat odstopanja simuliranega signala elektronske paramagnetne resonance
α	kot dentinskih kanalov glede na vzdolžno os skozi središče zobne pulpe
β	kot hidroksiapatitnih kristalov proti dentinskim kanalom
χ^2	ujemanje spektrov elektronske paramagnetne resonance
ψ	kot med smerjo magnetnega polja in smerjo HA kristalov
ϑ	kot smeri hidroksiapatitnih kristalov proti Z osi vzorca dentina
ϑ_{SIM}	odklon preferenčne smeri hidroksiapatitnih kristalov od pravokotnice na smer dentinskih kanalov
φ	kot dentinskih kanalov glede na Z os vzorca dentina

1 UVOD

Dentin oblikuje osnovo zoba in je po vsej svoji debelini prepreden z dentinskimi kanali (DK), ki iz površine pod različnimi koti potekajo proti pulpini votlini. Gostota DK ter njihov premer variirata med različnimi vrstami živali, med različnimi zobmi ter med različnimi področji v zobu. Steno DK obdaja hipermineraliziran peritubularni dentin (PTD), čigar debelina narašča proti površini zoba. Okoli PTD se nahaja slabše mineraliziran intertubularni dentin (ITD), ki predstavlja največji del dentina.

Organski del dentina predstavljajo predvsem kolagena vlakna, ki v dentinu v večji meri potekajo vzporedno z vzdolžno osjo zoba in uravnavajo nalaganje in usmeritev hidroksiapatitnih (HA) kristalov. Del kristalov s svojo vzdolžno osjo leži vzporedno s potekom vlaken. V svoji strukturi vsebujejo HA kristali nečistoče v obliki karbonatnih skupin. Po obsevanju kristalov iz teh skupin nastanejo paramagnetne zvrsti, ki jih zaznamo z elektronsko paramagnetno resonanco (EPR). Ker je signal EPR v dentinu kotno odvisen, lahko določimo usmeritev urejenih HA kristalov, s primerjavo izračunanih in simuliranih spektrov pa lahko ugotovimo delež le-teh. Določitev usmeritve urejenih HA kristalov je pomembna, saj so mehanske lastnosti dentina povezane tudi z usmeritvijo mineralnih snovi.

Da bi lahko ugotovili evolucijske prilagoditve dentina na sile med grizenjem, smo primerjali mikrostrukturo zob krokodila z mikrostrukturo zob nekaterih drugih vrst živali in človeka. Skozi milijone let se zobje plazilcev- poddružine krokodilov niso kaj dosti spremenili. Krokodili imajo polifiodontni tip zob, vendar so med vsemi plazilci edini, ki imajo zobe s pozobnico pritrjene v kost, kar nam omogoča primerjavo s psom, prašičem, konjem in človekom. Prilagojeni so izredno močnim pritiskom griznih sil, zlasti v smeri premika zgornje k spodnji čeljusti.

1.1 Namen in hipoteze

Namen naše raziskovalne naloge je bil:

- določiti naklon DK v zobni korenini glede na vertikalno os skozi središče zobne pulpe pri različnih živalskih vrstah in človeku;
- določiti usmerjenost HA kristalov pri različnih živalskih vrstah in človeku;
- določiti delež urejenih HA kristalov v dentinu v primerjavi z naključno razporejenimi pri različnih živalskih vrstah in človeku;
- ugotoviti, ali se delež urejenih HA kristalov v dentinu in razmerje med urejenimi in naključno razporejenimi kristali razlikujeta med različnimi živalskimi vrstami ter med živalmi in človekom.

Z raziskavo smo skušali potrditi naslednje hipoteze:

- delež urejenih HA kristalov je v dentinu različnih živalskih vrst in človeka različen;
- majhen delež HA kristalov v dentinu je urejen, večji delež pa naključno razporejen;
- mikrostruktura dentina krokodiljih zob se razlikuje od ostalih živalskih in človeških zob.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 Zobje in grizne sile

Živali uporabljajo različno oblikovane zobe za lovljenje, prijemanje, trganje in tudi žvečenje hrane. Uporabljajo jih tudi za napad plena, obrambo teritorija in haremov, samice pa v času estrusa tudi grizejo prekomerno zainteresirane samce. Mešanica različnih tipov zob v čeljust ter sama velikost čeljusti variirajo med posameznimi vrstami (Atkins, 2009).

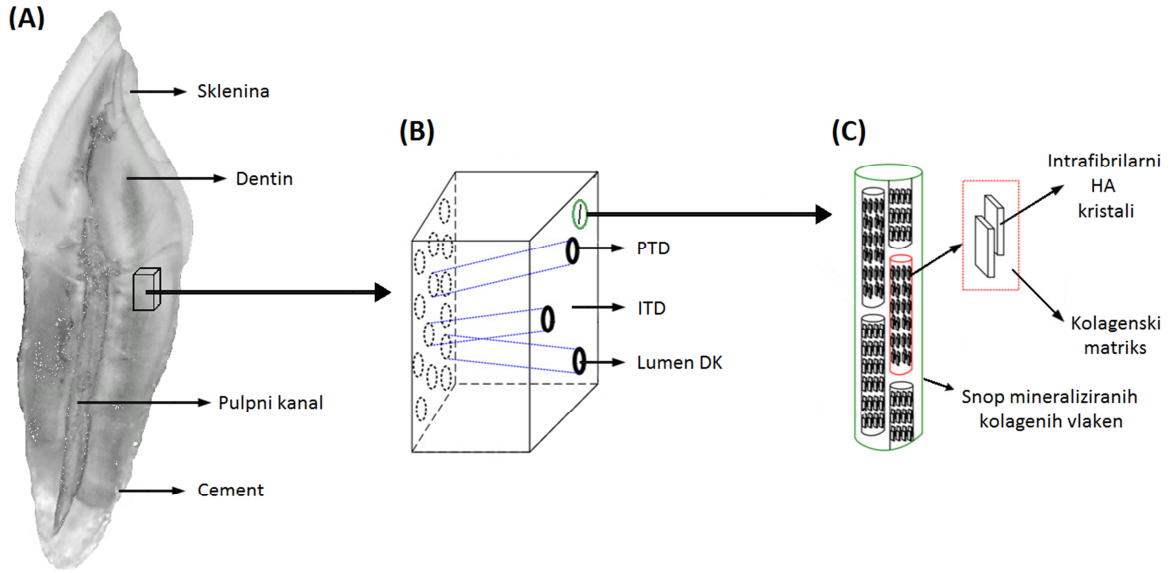
Med grizenjem in žvečenjem so zobje izpostavljeni različnim obremenitvam in ravno zaradi elastičnosti dentina odporni na zlome (Pashley, 1996; Wang in Weiner, 1998; Kinney in sod., 2003b). Ambica in sod. (2013) so ugotovili, da se človeški zgornji sekalci v kronskem delu zlomijo pri silah 935,03± 33,35 N, medtem ko vratni del korenine sekalcev vzdrži za več kot tretjino višje sile (1336 N (1160- 1685 N)) (Jantarat in sod., 2003).

Grizne sile, ki delujejo na zobe, med posameznimi vrstami živali zelo variirajo. Odvisne so od velikosti živali (Ellis et al., 2008; Lepley et al., 2011), velikosti glave (Anderson et al., 2008), spola (Koc et al., 2010) in starosti (Huthmann et al., 2009; Koc et al., 2010). Pri krokodilu, na primer, je najbolj pomembna telesna masa (Erickson et al., 2012). Moč griznih sil se v ustni votlini veča iz rostralnega proti kavdalnemu delu (Huthmann et al., 2009; Erickson et al., 2012). Pri človeku znašajo maksimalne grizne sile v področju kočnikov med 383,9± 102,3 N in 392,3± 150,1 N (Živko-Babić et al., 2002; Lepley et al., 2011) ter so znatno nižje kot pri psu in krokodilu. Pri slednjih dveh vrstah znašajo maksimalne grizne sile v istem področju 3417 N (Ellis et al., 2008) in 13 172 N (Erickson et al., 2004). Pri prašiču so povprečne grizne sile med hranjenjem v področju ličnikov 560 N (Bousdras in sod., 2006), v področju kočnikov konja pa 1956 N (Huthmann in sod., 2009).

2.2 Organska strukturiranost dentina

Dentin oblikuje osnovo zoba in je neožiljeno, mineralizirano vezivno tkivo, ki določa obliko zoba (Mjör in Pindborg, 1973). V primerjavi s sklenino je slabše mineraliziran in zato mehkejši ter se hitreje obrabi (Craig, 1993). V kronskem delu ga pokriva močno mineralizirana sklenina, v koreninskem delu pa cement, ki sodeluje tudi pri pritrditvi zoba v čeljustno kost (Nanci in Ten Cate, 2008) (slika 1A). Dentin vretenčarjev ima kompleksno zgradbo, katere osnova je pri različnih živalskih vrstah in človeku precej podobna (Lopes in sod., 2006; Robb in sod., 2007; Lopes in sod., 2009). Sestavljen je iz organskega ter anorganskega dela in vode, in sicer iz približno 70 utežnih odstotkov anorganskega materiala (50 volumskih odstotkov), 20 odstotkov organskega materiala (30 volumskih odstotkov) ter 10 odstotkov vode in drugih snovi (20 volumskih odstotkov) (Goldberg in sod., 1995; Nanci in Ten Cate, 2008; Enax in sod., 2013). Ker se voda primarno nahaja v dentinskih kanalih (DK), njihov premer pa se od pulpine votline proti dentinsko-skleninski (DSM) in dentinsko-cementni meji (DCM) manjša, predstavljajo ti odstotki le povprečne vrednosti. Vsebnost vode je v površinskem dentinu približno 20-krat nižja kot v dentinu blizu pulpe (Pashely, 1996).

Organski del dentina predstavljajo odontoblasti s Tomesovimi podaljški, ki po DK potekajo proti DSM in DCM (Nanci in Ten Cate, 2008) ter kolagen in nekolagene matriksne beljakovine (Goldberg in Lasfargues, 1995).



Slika 1: Makroskopska in mikroskopska strukturiranost zoba in dentina. (A) Človeški sekalec. (B) Shematski prikaz mikrostrukture dentina z dentinskimi kanali (DK), obdanimi s hipermineraliziranim ovojem peritubularnega dentina (PTD). Obe strukturi sta vgrajeni v slabše mineraliziran intertubularni dentin (ITD). V ITD del snopov kolagenih vlaken poteka pravokotno na DK oz. vzporedno z vzdolžno osjo zoba, preostanek pa je naključno urejen. (C) Snop je sestavljen iz urejenih kolagenih vlaken, kjer *c*-osi hidroksiapatitnih (HA) kristalov potekajo vzporedno z osjo vlaken. Delno povzeto po: Bar-On in Wagner (2012).

Figure 1: Macroscopic and microscopic structure of tooth and dentin. (A) Human incisor. (B) Schematic presentation of the dentin microstructure with dentinal tubules (DK) surrounded by hypermineralized peritubular dentin (PTD), and embedded inside less mineralized intertubular dentin (ITD). A part of bundles of mineralized collagen fibrils in ITD run perpendicular to the DK or parallel to the longitudinal axis of the tooth and the rest are randomly oriented. (C) A bundle is composed of staggered collagen fibrils where *c*-axes of hydroxyapatite (HA) crystals run parallel to the axis of fibrils. Partially adapted from: Bar-On in Wagner (2012).

2.2.1 Odontoblasti in njihova diferenciacija

Nastanek zasnove zoba je rezultat zapletenih recipročnih vplivov med ustnim epitelom in ektomezenhimom, ki deloma izvira iz nevralne letvice. Ti vplivi so uravnavani z ligandi in receptorji (Thesleff, 2003) in so vključeni v morfogenezo ter diferenciacijo celic (Linde in Goldberg, 1993).

Prvi morfološki znak razvoja zoba je lokalna zadebelitev dentalnega epitela, ki se vgrezne v spodaj ležeči ektomezenhim (Thesleff, 1991). Odontogene mezenhimske celice se zgostijo in

brsteči se epitel jih začne od zgoraj objemati. Celice epitela se nato pretvorijo v skleninski organ, iz mezenhimskih celic poleg konice epitelnega brsta pa se razvije dentalna papila (Nanci in Ten Cate, 2008). Le-ta raste in celice, ki ležijo v tesnem stiku z bazalno membrano (BM) ter direktno pod skleninskim epitelom, se dokončno diferencirajo v odontoblaste, spodaj ležeče pa v zobno pulpo. Iz ostalih celic mezenhima, ki oblikujejo zobni folikel, se razvijejo podporna tkiva zoba (Thesleff, 1991).

Za dokončno diferenciacijo odontoblastov so značilni naslednji koraki:
1) preodontoblasti končajo s celičnim ciklom. Med zadnjo delitvijo ležijo mitotična vretena pravokotno na epitelno-mezenhimsko mejo in BM (Ruch, 1987);
2) hčerinska celica, ki je v stiku z BM, se podaljša in polarizira: jedro se pomakne proti bazi celice, hrapav endoplazemski retikulum se postavi vzporedno z dolgo osjo celice, hkrati pa se v njej oblikujejo tudi številna sekretorna zrnca in Golgijev aparat;
3) hčerinske celice pričnejo najprej s sintezo nemineraliziranega matriksa, t.i. predentina, ki kasneje mineralizira (Butler in Ritchie, 1995; Ruch in sod., 1995).

Končna polarizacija odontoblastov vodi do razdelitve celice na celično telo z organeli, potrebnimi za izgradnjo izvenceličnega matriksa, ter na dolg podaljšek, ki sega na začetku v predentin, kasneje pa tudi v dentin (Goldberg in sod. 1995). Hkrati mejni kompleksi oblikujejo bariero ter tako izolirajo zobno pulpo od predentinskega zunajceličnega prostora (Linde in Goldberg, 1993).

Dentinogeni odontoblasti so aktivno vključeni v izgrajevanje, izločanje in reabsorbcijo komponent matriksa. Medtem ko se izgrajevanje vrši v telesu odontoblasta, se eksocitoza in endocitoza primarno odvijata v celičnem podaljšku (Linde in Goldberg, 1993).

Oblikovanje dentina se prične z izgradnjo organskega predhodnika dentina, t.i. predentina, ki v določeni razdalji od telesa odontoblasta mineralizira. Topografsko gledano se prične predentin nalagati najprej na mestih, kjer se bodo kasneje razvili vrški zob. Ker se diferenciacija odontoblastov nadaljuje iz tega mesta v apikalni smeri, se v isti smeri nadaljuje tudi začetno izgrajevanje dentina, medtem ko v tem času kronska plast predentina oz. kasneje dentina začne pridobivati na debelini (Nanci in Ten Cate, 2008).

Odontoblasti ležijo na periferiji zobne pulpe oz. na notranji površini dentina ter so najpomembnejši funkcionalni element dentina, saj so, če so primerno stimulirani, skozi svoje celotno življenje sposobni sintetizirati dentin (Nanci in Ten Cate, 2008). Izločajo komponente zunajceličnega matriksa, kamor se nalaga anorganski kalcijev fosfat v obliki hidroksiapatitnih (HA) kristalov (Linde in Lundgren, 1995). Uravnavajo dotok kalcija in fosfata ter proizvajajo rastne faktorje in encime (Boskey, 1991). Skozi celotno življenje sintetizirajo fiziološki sekundarni dentin, ki postopno zožuje pulpino votlino. Ta proces ima tudi praktičen pomen, saj bi drugače zaradi atricije prišlo - npr. pri konjih - na grizni ploskvi do izpostavitve zobne pulpe (Dixon, 2002). Na dražljaje, kot npr. travmatsko poškodbo, infekcijo ali prekomerno atricijo, se odontoblasti odzovejo s sklerozacijo DK. Le-ta prepreči mikroorganizmom ali njihovim molekularnim proizvodom dostop do zobne pulpe in predstavlja poleg izgradnje reparativnega dentina dodatni obrambni mehanizem (Pashley, 1996). Število odontoblastov korelira s številom DK, oblika pa z mestom, kjer se nahajajo; v kronskem delu so hruškaste oblike, v vratnem kuboidni ter v apikalnem vretenasti (Nanci in Ten Cate, 2008).

Odontoblastni oz. Tomesovi podaljški se oblikujejo na vratu celice in segajo različno globoko v dentin; od 0,5 mm pa vse do nekaj mm oz. do DSM (Garberoglio in Brännström, 1976; Kilic, 1997). Naloga Tomesovih podaljškov ter okolne tekočine, ki izpolnjuje DK, je tudi prenašanje bolečine v zobno pulpo (Pashley, 1996).

2.2.2 Organski del dentina

Organski matriks dentina je sestavljen iz približno 90% netopnih kolagenih vlaken tipa I, ostali del pa predstavljajo nekolagene matriksne beljakovine (Goldberg in Lasfargues, 1995). Primarna naloga organskega matriksa dentina je določitev tridimenzionalne morfologije mineraliziranega tkiva (Linde in Lundgren, 1995), saj je vanj vrinjen anorganski mineralni del, ki ga sestavljajo HA kristali (Pashley, 1989).

Ugotovljeno je bilo, da med peritubularnim dentinom (PTD) in intertubularnim dentinom (ITD) obstajajo strukturne in sestavne razlike organskega matriksa (Xu in Wang, 2012), med katere prištevamo relativno višjo vsebnost nekolagenih beljakovin v PTD (Gotliv in sod.,

2006) ter odsotnost oz. zelo nizko vsebnost kolagena v PTD (Bertassoni in sod., 2012; Xu in Wang, 2012).

2.2.2.1 Kolagen

Dentinska kolagena vlakna predstavljajo kompaktno maso, ki je sestavljena večinoma iz kolagena tipa I (Goldberg in Lasfargues, 1995). Vsebnost kolagena je v kronskem delu dentina (166,49± 49,4 µg kolagena/ mg dentina) primerljiva s koreninskim delom (131,99± 21,5 µg kolagena/ mg dentina) (Miguez in sod., 2004). V ITD del kolagenih vlaken v bližini DK poteka cirkumferentno okoli njih (Gotliv in Veis, 2007), medtem ko jih večina poteka pravokotno na DK oz. vzporedno s površino predentina oz. vzdolžno osjo zoba (Sögaard-Pedersen in sod., 1990; Wang in Weiner, 1998; Muylle in sod., 2000; Kinney in sod, 2001; Miguez in sod., 2004; Elbaum in sod., 2007; Inoue in sod., 2011) (slika 1B). Zaradi specifičnega poteka kolagenih vlaken je dentin anizotropen (Kinney in sod., 2001; Hellmich in Ulm, 2002; Kinney in sod., 2003b). Avtorji si glede vsebnosti kolagena v PTD še vedno niso enotni; nekateri trdijo, da v PTD ni kolagena (Muylle in sod., 2001; Gotliv in sod., 2006; Habelitz in sod., 2007; Gotliv in Veis, 2007; Gotliv in Veis, 2009; Bertassoni in sod., 2012), medtem ko drugi tem ugotovitvam nasprotujejo in trdijo, da ga vsebuje majhen del (Dai in sod., 1991; Breschi in sod., 1993; Magne in sod., 2002; Xu in Wang, 2012). Nekateri od slednjih so celo ugotovili, da vlakna v PTD potekajo cirkumferentno okoli DK (Breschi in sod., 1993).

Premer kolagenih vlaken je pri človeku približno 100 nm (Sögaard-Pedersen in sod., 1990) ter pri psu 30- 180 nm (Tanaka, 1989) in so med seboj večinoma prepletena, nekaj pa se jih med seboj povezuje tudi v svežnje (Sögaard-Pedersen in sod., 1990). Oblikujejo mrežno matrico, kjer v luknjah in porah ter na njihovi površini in v neposredni bližini ležijo HA kristali (Nanci in Ten Cate, 2008). Najpomembnejša naloga kolagene mreže je nadzor uravnavanja nalaganja in usmeritve HA kristalov, kjer intrafibrilarni kristali ležijo s svojo vzdolžno oz. *c*-osjo vzporedno z vzdolžno osjo kolagenega vlakna (Glimcher, 1968).

2.2.2.2 Nekolagene matriksne beljakovine

Med nekolagene matriksne beljakovine dentina prištevamo proteoglikane (hondroitin sulfat, dermatan sulfat), glikoproteine (z glutaminsko kislino bogate beljakovine ali Gla- beljakovine (osteokalcin) in fosfoproteine (fosfoforin, osteonektin, osteopontin, dentinski sialoprotein, idr.), lipide (holesterol in njegovi estri, triacilglicerol, fosfolipidi) in serumske proteine, kot npr. albumin (Goldberg in sod., 1995).

Proteoglikani sodelujejo pri preoblikovanju kolagenih vlaken v tridimenzionalno mrežo, ki jo med seboj povezujejo fosfoproteini (Butler, 1995). Zanje je značilno, da so močno fosforilirani (Yamakoshi in sod., 2008) in imajo specifično afiniteto za kolagen (Dahl et al., 1998), zato je njihova koncentracija v ITD višja kot v PTD. Eden najpomembnejših fosfoproteinov je fosfoforin, ki sodeluje pri ionski nukleaciji HA kristalov v in na kolagenski mreži (Boskey, 1991; Mann, 1993), saj ima veliko afiniteto za vezavo Ca^{2+} ionov (Butler, 1995), hkrati pa najverjetneje uravnava tudi njihovo usmeritev in začetno rast v smeri *c*-osi (Mann, 1993) ter nadzoruje velikost in obliko bodočega kristala (Nanci in Ten Cate, 2008). Fosfoforin tako povzroči direktno nukleacijo HA kristalov in nase veže nanokristale, ki so se oblikovali v matriksnih veziklih (Butler, 1995). PTD ne vsebuje fosfoforinov (Weiner in sod., 1999), čeprav ima v svoji zgradbi višjo koncentracijo fosforiliranih proteinov kot ITD (Gotliv et al., 2006). Med te prištevamo ostale fosfoproteine ter Gla- beljakovine, ki imajo veliko afiniteto za vezavo kalcijevih ionov, in lahko sprožijo nukleacijo HA kristalov ter tako najverjetneje sprožijo mineralizacijo PTD, kjer je koncentracija mineralov višja kot v ITD (Habelitz in sod., 2007).

2.3 Dentinogeneza

2.3.1 Dentinski kanali

Podaljški odontoblastovležijo v DK, ki se raztezajo po celotni dolžini dentina (Costa in sod., 2002) od zobne pulpe v predentinu do DSM oziroma DCM (Sögaard-Pedersen in sod., 1990; Muyle in sod., 2001). Potek DK nakazuje pot, ki jo je odontoblast opravil med dentinogenezo (Nanci in Ten Cate, 2008). V zobni kroni posnema obliko podolgovate črke »S« (Kilic in sod., 1997; Muyle in sod., 2001; Costa in sod., 2002; Nanci in Ten Cate, 2008), ki nastane zaradi centripetalne rasti dentina in posledičnega gneteža odontoblastov (Muylle in sod., 2001; Nanci in Ten Cate, 2008), medtem ko je njihov potek v koreninskem delu bolj raven. Najbolj raven potek imajo DK v zgornji tretjini zobne korenine (Nanci in Ten Cate, 2008) in pod grizno ploskvijo (Muyle in sod., 2001; Muylle in sod., 2002; Nanci in Ten Cate, 2008).

Sistem kanalov po celotni dolžini z notranje strani obdaja organski ovoj, t.i. lamina limitans (Muylle in sod., 2000; Bertassoni in sod., 2012), lumen pa je napolnjen s citoplazemsko tekočino ter do določene dolžine s podaljški odontoblastov (Kinney in sod., 2001).

Dentinski kanali so stožčasto oblikovane strukture, katerih premer se proti periferiji dentina oža in tako ob pulpini votlini predstavljajo pri človeku okoli 22% površine dentina, na periferiji pa le okoli 1% (Pashley in sod., 1989). V kronskem delu človeškega zoba imajo premer 2,0 do 3,2 µm ob zobni pulpi, 0,8 do 1,6 µm v srednjem delu dentina in 0,5 do 1,2 µm blizu DSM (Garberoglio in Brännström, 1976- PM and M) ter v korenini zoba 1,7 do 2,1 µm ob pulpi in 0,7 do 1,3 µm ob DCM (Chu in sod., 2010). Pri psu je njihov premer v področju cementno-skleninske meje (CSM) ob pulpi 2,0 do 2,9 µm ter na periferiji 1,7 do 2,9 µm (Robb in sod., 2007), pri prašiču v povprečju merijo 2,0 µm (Dauphin in sod., 2013), pri konju pa blizu DSM 2,7 µm in v sekundarnem dentinu 3,2 µm (Kilic in sod., 1997). V krokodiljem dentinu je opisan le povprečen premer DK, ki znaša 1- 1,5 µm (Dauphin in Williams, 2008).

Gostota DK se v različnih tipih zob razlikuje (Garberoglio in Brännström, 1976; Schellenberg in sod., 1992) ter tudi glede na sam položaj v zobu. Njihovo število pada od zobne pulpe proti periferiji (Garberoglio in Brännström, 1976; Kilic in sod., 1997; Chu in sod., 2010) ter iz

kronskega proti koreninskemu delu zoba (Chu in sod., 2010). V kronskem delu je pri človeku njihova gostota ob zobni pulpi med 30 000 in 52 000/ mm^2 (Garberoglio in Brännström, 1976), ter v koreninskem med 25 300 in 32 300/ mm^2 (Komabayashi in sod., 2008) in se do DSM (Garberoglio in Brännström, 1976) oz. DCM približno razpolovi (Schellenberg in sod., 1992; Komabayashi in sod., 2008). Pri psu je v višini DSM zgornjega grabilca gostota DK ob zobni pulpi okoli 30 000/ mm^2, na periferiji dentina pa okoli 47 000/ mm^2 (Robb in sod., 2007), pri konju pa 28 000 do 58 000/ mm^2 v sekundarnem dentinu in 10 000 do 25 000/ mm^2 v osrednjem delu primarnega dentina v področju grizne ploskve zoba (Muylle in sod., 2002). Gostota DK raste proti notranjosti dentina zaradi vedno manjšega prostora, ki ga imajo na voljo odontoblasti, ko pulpina votlina postaja vse ožja.

Dentinski kanali imajo neravne stene, iz katerih izhajajo po celotni dolžini številne stranske veje, ki oblikujejo mrežo, preko katere sosednji DK komunicirajo med seboj (Pashley, 1989; Lu in sod, 2007). Njihov premer je okoli 300 do 700 nm, pojavljajo pa se predvsem v področjih, kjer je število DK relativno nizko, torej v koreninskem delu zoba (Mjör in Nordahl, 1996). Po celotnem dentinu se razpredajo iz DK tudi mikro veje oz. kanalikuli premera 25 do 200 nm (Mjör in Nordahl, 1996; Muylle in sod., 2000; Lu in sod., 2007), na periferiji dentina, predvsem v kronskem delu zoba, pa se DK razcepijo na 0,5 do 1,0 µm široke glavne veje (Mjör in Nordahl, 1996).

Tubularnost določa prepustnost dentina in je glede na položaj v zobu zelo različna. Višja je v področju večje gostote DK v bližini zobne pulpe kot na periferiji dentina (Pashley in sod., 1987). Skozi DK se odvija tok dentinske tekočine proti periferiji ter pasaža- npr. mikrobnih komponent - proti notranjosti (Vongsavan in Matthews, 1992).

2.3.2 Peritubularni dentin

Dentinski kanali, v katerih ležijo podaljški odontoblastov, so obdani s tankim pasom PTD (Marshall in sod., 2001, Habelitz in sod, 2007) (slika 1B), ki je pri človeku približno 9% (Miller in sod., 1971) do 40% bolj mineraliziran kot preostali ITD (Nanci in Ten Cate, 2008), medtem ko je pri konju le do 9% bolj mineraliziran (Magne in sod., 2002). Volumska vsebnost HA kristalov se v tem delu giblje med 60 in 92% (Marshall in sod., 2001; Xu in Wang, 2012), HA kristali pa imajo obliko ploščic (Schroeder in Frank, 1985; Weiner in sod., 1999) in so po velikosti podobni tistim v ITD (Weiner in sod., 1999; Gotliv in sod., 2006). Med različnimi avtorji so mnjenja o urejenosti HA kristalov v PTD različna; nekateri trdijo, da so urejeni podobno kot kristali v ITD (Gotliv in sod., 2006; Gotliv in Veis, 2009), drugi, da so naključno razporejeni (Schroeder in Frank, 1985) in spet tretji, da je PTD sestavljen iz lokalno urejenih domen, v katerih je približno polovica HA kristalov s svojimi *c*-osmi poravnana v isto smer (Weiner in sod., 1999).

Poleg nestrinjanja glede urejenosti HA kristalov v PTD si avtorji nasprotujejo tudi glede vsebnosti kolagena (Dai in sod., 1991, Muylle in sod., 2001; Magne in sod., 2002; Qin in Swain, 2004; Gotliv in sod., 2006; Gotliv in Veis, 2007; Habelitz in sod., 2007; Gotliv in Veis, 2009; Xu in Wang, 2012;). Tisti, ki zatrjujejo, da v PTD ni kolagena, menijo, da je organski matriks PTD kompleksna mešanica kislih beljakovin in fosfolipidov z majhnim deležem glikoproteinov in proteoglikanov (Weiner in sod., 1999; Gotliv in sod., 2006; Gotliv in Veis, 2007). PTD naj bi bil tako sestavljen iz približno 13% nekolagenih proteinov, ostali del pa predstavlja anorganska faza (Gotliv in sod., 2006).

Izgradnja PTD se prične na meji med plaščnim dentinom in dentinom okrog pulpine votline (Weiner in sod., 1999) in mineralizira skupaj z mineralizacijsko fronto ITD (Habelitz et al, 2007). Pri ljudeh se v bližini mineralizacijske fronte v predentinu pojavlja le ITD, medtem ko se začne PTD pojavljati nekoliko bolj stran od predentinsko-detinske meje (Linde in Goldberg, 1993). Širina PTD se v zgornji tretjini korenine človeškega molarja veča proti površini zoba, in sicer meri v bližini pulpe med 0,00 in 0,33 µm ter ob površini dentina 0,55 do 1,05 µm (Chu in sod., 2010). Podoben trend širjenja PTD proti periferiji dentina je bil

opažen tudi pri konju (Muylle in sod., 2001; Muylle in sod., 2002), medtem ko za ostale živalske vrste v literaturi nismo našli podatkov. Širjenje PTD proti DSM oz. DCM povzroči progresivno ožanje premera DK (Garberoglio in Brännström, 1976).

Peritubularni dentin predstavlja fenestriran cilinder okoli dentinskih kanalov. V njegovi steni so številne manjše pore, ki najverjetneje omogočajo izmenjavo tekočin in ionov med lumnom dentinskega kanala oz. podaljškom odontoblasta in ITD (Gotliv in Veis, 2007; Gotliv in Veis, 2009). Negativno nabita površina por najverjetneje služi tudi kot selektivni regulator transporta ionov med DK in ITD (Gotliv in Veis, 2009).

Pod elektronskim mikroskopom (EM) ter mikroskopom na atomsko silo ima PTD bolj homogeno strukturo kot kolagen vsebujoči ITD (Habelitz in sod., 2007; Gotliv in Veis, 2009) in zato različne elastične (Kinney in sod., 1996a) in lomne lastnosti (Wang, 2005) ter optično anizotropijo (Iwamoto in Ruse, 2003). Lomne ploskve PTD so pod EM relativno gladke, medtem ko so lomne ploskve ITD videti neravne (Boyde in Lester, 1967).

Vloga PTD dandanes še vedno ni povsem jasna, vendar nekateri avtorji predvidevajo, da bi lahko njegova višja togost vplivala na upočasnjeno širjenje pok v dentinu (Habelitz in sod, 2007), hkrati pa višja vsebnost mineralov tudi zviša odpornost dentina proti obrabi (Kierdorf in Kierdorf, 1992).

2.3.3 Intertubularni dentin

Največji del dentina predstavlja ITD, ki primarno sestoji iz mineraliziranih kolagenih vlaken (slika 1B). Volumsko vsebuje približno 43% HA kristalov (Bar-On in Wagner, 2012) ter 30% kolagenih vlaken tipa I (Nanci in Ten Cate, 2008). Dentinska mineralizirana vlakna se med seboj združujejo v mrežo, ki je v ITD v dveh dimenzijah neurejena, v tretji pa poteka vzporedno z rastnimi linijami (Sögaard-Pedersen in sod., 1990; Wang in Weiner, 1998; Kinney in sod, 2001a; Inoue in sod., 2011). Le-ta potekajo okoli DK cirkumferentno (Gotliv and Veis, 2007), večina pa jih leži pravokotno nanje (Sögaard-Pedersen in sod., 1990; Kinney in sod, 2001a; Inoue in sod., 2011). Vsako mineralizirano vlakno je sestavljeno iz kolagenega

ogrodja, v katerem se nahajajo tanki, ploščicam podobni kristali karbonatnih apatitov, katerih *c*-osi rastejo vzporedno z vzdolžno osjo kolagenih vlaken (Landis in sod., 1993; Linde in Goldberg, 1993; Houllé in sod., 1997; Ehrlich in sod., 2010).

Površina ITD se glede na lokacijo v zobu spreminja, in sicer ga je v človeškem zobu v področju predentina približno 12%, do DSM pa njegova količina naraste na približno 96% (Pashley, 1989).

2.3.4 Oblikovanje dentina okrog pulpine votline

2.3.4.1 Plaščni dentin

Dentin okrog pulpine votline predstavlja glavno maso dentina in se med odontogenezo oblikuje v relativno kratkem času. Njegov periferni del, ki se nahaja tik pod sklenino v kronskem delu zoba (Linde in Lundgren, 1995) in pri človeku meri približno 150± 50 µm (Herr in sod., 1986), se imenuje plaščni dentin (Linde in Lundgren, 1995). Prvi kolagen se v dentinu pojavi zunaj odontoblastov kot široka, t.i. von Korffova vlakna (premera 0,3- 0,5 µm), ki se združujejo v brezstrukturni osnovni snovi takoj pod BM (Jean in sod., 1986). Ta vlakna so sestavljena iz kolagena tipa III (Ohsaki in Nagata, 1994) in potekajo pravokotno na BM oz. vzporedno s podaljški odontoblastov (Nanci in Ten Cate, 2008). Odontoblasti proizvajajo tudi tanjša vlakna kolagena tipa I (premera okoli 100 nm), ki ležijo vzporedno s stalno nastajajočim predentinom ali pravokotno nanj (Sögaard-Pedersen in sod., 1990).

Naslednja značilnost plaščnega dentina so matriksni vezikli premera 0,1- 0,2 µm, ki izvirajo iz odontoblastov. Mineralna faza se najprej pojavi prav v njih kot posamezni HA kristali (Bonucci, 1984), ki rastejo zelo hitro in pretrgajo kontinuiteto veziklov. V organskem matriksu se med seboj združujejo v svežnje, le-ti pa se združujejo med seboj in tako oblikujejo neprekinjen sloj mineraliziranega matriksa. Takšni mineralizaciji pravimo globularna mineralizacija. Med mineralizacijo matriksa odontoblasti proizvajajo tudi nekolagene matriksne beljakovine, ki naj bi uravnavale rast in usmeritev kristalnega jedra ter po končanem oblikovanju le-tega nadzorovale tudi velikost in obliko bodočega HA kristala

(Houllé in sod., 1997). Odontoblasti se v tem času pričnejo pomikati proti centru pulpe in za seboj puščajo odontoblastne oz. Tomesove podaljške (Nanci in Ten Cate, 2008). Šele po tej fazi se HA kristali pojavijo tudi v povezavi s kolagenimi vlakni (Linde in Lundgren, 1995).

Ker je koncentracija mineralov v plaščnem dentinu nižja kot v dentinu okrog pulpine votline (Verdelis in sod., 2007), je nižja tudi njegova trdota (Wang in Weiner, 1998). Prav tako, za razliko od dentina okrog pulpine votline, v njem ni fosfoproteinov (Takagi in sod., 1986) in DK (Mjör in Nordahl, 1996).

2.3.4.2 Primarni in sekundarni dentin

Ko je plaščni dentin oblikovan, se dentinogeneza nadaljuje na nekoliko drugačen način. Odlaganje mineralov vedno nekoliko zaostaja za izgrajevanjem organskega matriksa, zato se med odontoblasti in mineralizacijsko fronto pojavlja 10- 40 µm širok sloj, imenovan predentin (Linde in Lundgren, 1995). Kolagena vlakna dentina okrog pulpine votline so v največji meri tipa I in so si med seboj razporejena bližje ter so bolj prepletena kot v plaščnem dentinu (Goldberg in Lasfargues, 1995). Ta vlakna v glavnem ležijo pravokotno na DK in vzporedno z DSM oz. z vzdolžno osjo skozi središče korenine (Sögaard-Pedersen in sod, 1990; Linde in Goldberg, 1993; Wang in Weiner, 1998; Kinney in sod., 2001; Wiesmann in sod, 2005).

Največji delež dentina okrog pulpine votline predstavlja primarni dentin, ki se med izgrajevanjem zoba tvori zelo hitro. Za razliko od plaščnega dentina je primarni dentin v celoti proizvod odontoblastov, hkrati pa je bolj kompakten tudi njegov kolagenski matriks (Ten Cate, 1998). Primarni dentin oblikuje osnovo zoba in mu daje genetsko zasnovano velikost in obliko (Nanci in Ten Cate, 2008). Nekateri avtorji so mnenja, da se njegova tvorba zaključi, ko je izgrajena krona (Romagnoli in sod., 1990), drugi da šele, ko zobje pričnejo opravljati svojo funkcijo (Linde in Goldberg, 1993) in spet tretji, ko je zobna korenina popolnoma izoblikovana (Nanci in Ten Cate, 2008).

Sintezi primarnega sledi mnogo počasnejša sinteza sekundarnega dentina. Strukturi obeh se le malo razlikujeta; potek DK je v sekundarnem dentinu nekoliko drugačen, struktura kanalčkov je manj pravilna, hkrati pa je lahko neenakomerna tudi njegova izgradnja (Nanci in Ten Cate, 2008). Pri konju je meja med primarnim in sekundarnim dentinom zelo izrazita, saj se PTD tvori le v primarnem dentinu (Muylle in sod., 2001; Muylle in sod., 2002).

2.3.4.3 Terciarni dentin

Terciarni dentin odontoblasti izgrajujejo kot odgovor na zunanje dražljaje, npr. travmatske poškodbe zoba, kariesa, prekomerne atricije, abrazije ali erozije ter oblikovanja kavitete (Cox in sod., 1992). Poznana sta dva tipa, in sicer reakcijski, ki je proizvod že obstoječih odontoblastov in nastane zaradi blage poškodbe, in reparativni. Slednji nastane ob hujših poškodbah, ki uničijo odontoblaste, novi pa se izdiferencirajo iz progenitornih ali pluripotentnih celic zobne pulpe. Reparativni dentin je izgrajen hitro in ker se celice pogosto ujamejo v matriks, ne vsebuje DK (Tziafas, 2010).

2.3.4.4 Transparentni dentin

S staranjem se normalni dentin spremeni v t.i. transparentni oz. sklerotični dentin (Vasiliadis in sod., 1983). Gre za proces postopnega zapolnjevanja DK z mineralno fazo, ki se prične v apikalnem delu korenine in se pogosto širi proti koronarnemu (Micheletti, 1998). Hidroksiapatitni kristali, ki zapolnjujejo lumen DK, so po navedbah nekaterih avtorjev nekoliko manjši kot v normalnem dentinu (Kinney in sod., 2005), medtem ko drugi menijo, da so večji (Nalla in sod., 2005; Porter in sod. 2005). Porter in sod. (2005) ter Nalla in sod. (2005) so ugotovili, da se velikost HA kristalov v ITD s staranjem značilno zmanjša in tako sklerozacija najverjetneje nastane zaradi uniformnega raztapljanja mineralov ITD ter njihovega pasivnega kemijskega precipitiranja v DK (Vasiliadis in sod., 1983). Kljub temu, da se kristali zmanjšajo, pa se koncentracija mineralov v ITD ne spremeni (Kinney in sod., 2005). Glavnina mineralne faze, ki zapolnjuje lumen DK, so HA kristali, nekaj pa je tudi nanometrskih zrnatih kristalov (Porter in sod. 2005).

2.4 Hidroksiapatitni kristal kot anorganski del dentina

Hidroksiapatitni kristal, s kemijsko formulo $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, je strukturna osnova mineralnega dela dentina, sklenine, cementa in kosti. Dentinski kristali so manjši kot skleninski (Hong in sod., 2006) in v povprečju merijo približno 36- 110 nm v dolžino (Elliott in sod., 2002; Zavgorodniy in sod., 2008), 4- 31 nm v širino (Elliott in sod., 2002; Porter in sod. 2005; Hong in sod., 2006) in so debeli približno 2- 5nm (Kinney in sod., 2001; Zavgorodniy in sod., 2008; Märten in sod., 2010). Na splošno velja, da imajo HA kristali v dentinu obliko ploščic (Nanci in Ten Cate, 2008; Gotliv and Veis, 2009).

Hidroksiapatitni kristali dentina imajo dva različna mehanizma nastanka, ki se v mineralizacijskem področju pojavita istočasno: 1. direktna nukleacija in rast HA kristalov (Houllé in sod., 1997) ter 2. nukleacija preko različnih kalcij-fosfatnih faz, v glavnem preko oktakalcijevega fosfata (OKF) (Bodier-Houllé in sod., 1998). Cuisinier in sod. (1995) so direktno nukleacijo in rast HA kristalov opisali kot proces, kjer na specifičnih, nukleacijskih mestih najprej pride do ionske adsorbcije in nukleacije nanometerskih delcev. Ta proces se večinoma odvija intrafibrilarno oz. na površini kolagenih vlaken (Landis in sod., 1993; Weiner in Wagner, 1998). Mineralni delci zaradi nadaljnega nalaganja ionov rastejo, njihovo rast pa uravnavajo organski matriks ter sosednji delci, ki rastejo v njem. Zaradi omejenosti prostora se pričnejo delci med seboj tudi združevati (Cuisinier in sod., 1995) in rastejo po dolžini vzporedno z osjo kolagene molekule (Landis in sod., 1993). V primeru nukleacije OKF pride najprej do oblikovanja kristalov OKF, kateremu sledi hitra hidroliza in končno pride do odlaganja HA na njihove stranice (Bodier-Houllé in sod., 1998).

Rast HA kristalov se odvija z njihovo vzdolžno oz. *c*-osjo vzporedno z vzdolžno osjo kolagenih vlaken (Landis in sod., 1993; Linde in Goldberg, 1993; Houllé in sod., 1997; Ehrlich in sod., 2010). Kristali se nahajajo v intersticijskem prostoru med kolagenimi vlakni- interfibrilarno ali pa v njihovih porah- intrafibrilarno (Landis in sod., 1996; Ehrlich in sod., 2010) (slika 1C). Kinney in sod., 2001 so mnenja, da se precejšen delež kristalov nahaja intrafibrilarno, kar v številkah pomeni okoli 56% vseh kristalov v dentinu (Nanci in Ten Cate, 2008), medtem ko drugi predvidevajo, da jih je med 20- 30% (Balooch in sod., 2008; Märten in sod., 2010).

Kljub temu, da naj bi se približno 56% HA kristalov nahajalo intrafibrilarno (Nanci in Ten Cate, 2008), je v kronskem delu dentina človeških zob stopnja urejenosti kristalnih delcev nizka (Tesch in sod., 2001), saj naj bi jih bilo vsaj 80% naključno razporejenih in največ 20% urejenih v določeno smer (Märten in sod., 2010).

Tip kristalov in hitrost njihovega nastanka sta v tesni povezavi z lokalnim pH, koncentracijo kalcija, fosfata ter drugih kemijskih ionov, kot tudi s prisotnostjo nabitih makromolekul (Linde in Lundgren, 1995). Biološki HA kristali vsebujejo v svoji strukturni sestavi številne ionske zamenjave in primanjkljaje ter tako v zobeh predstavljajo nečisto obliko HA. Med najpomembnejše ionske zamenjave prištevamo zamenjave PO_4^{3-} in OH^- ionov s CO_3^{2-} ioni. Na račun prvih menjav HA kristali izgubljajo svojo velikost v smeri *a*-osi (Elliot in sod., 2002; Leventouri, 2009; Ibrahim in sod., 2011) in so tako manjši kot čisti HA kristali (Elliot in sod., 2002; Ibrahim in sod., 2011). Na račun slednjih pa se večajo v smeri *a*-osi (Hong in sod., 2007). Takšni, t.i. HA kristali B-tipa, so bolj dovzetni za morebitne dodatne ionske izmenjave, kot npr. s fluorom (Leventouri, 2006), in jih je v bioloških apatitih nekje med 2 in 4 utežnimi % (Schramm in Rossi, 2000). Poleg teh menjav lahko hidroksilne ione zamenjajo kloridni ali fluoridni ioni (fluoroapatit je trši kot HA), kalcijeve ione pa lahko zamenjajo tudi magnezijevi ali natrijevi. Pri slednji menjavi pride do zmanjšanja kristala v smeri *c*- in *a*-osi (Hong in sod., 2006). Ionske zamenjave v HA kristalih določajo fizikalne lastnosti dentina, med katere prištevamo topnost in trdnost (Leventouri, 2006). Dentinski kristali z nižjo vsebnostjo kalcija ter višjo vsebnostjo karbonata so tako bolj dovzetni za raztapljanje s kislinami (LeGeros in Tung, 1983).

CO_3^{2-} ioni v strukturi HA kristala predstavljajo predhodnike številnih paramagnetnih zvrsti, ki nastanejo ob obsevanju kristala (Skalerič in sod., 1998; Schramm in Rossi, 2000). Med njih uvrščamo CO_2^- in CO_3^{3-} (Cevc in sod., 1980; Callens in sod., 1987), katerih simetrijska os je uravnana s vzdolžno osjo HA kristala (Cevc in sod., 1980). Taka snov je idealna za proučevanje z elektronsko paramagnetno resonanco (EPR).

Sestava anorganske snovi se spreminja glede na dostopnost ogljika in magnezija, glede na starost in zrelost kristalov, kot tudi glede na živalsko vrsto in tip trdega tkiva (Bonucci, 2007).

Ugotovljeno je bilo, da se kristaliničnost HA kristalov pri ljudeh s starostjo sistematično zmanjša. Kristaliničnost ostaja visoka približno do 45. leta starosti, nato pa začne upadati, kar sovpada s trendom zviševanja količine karbonata v strukturi kristalov (Leventouri in sod., 2009).

HA kristali se v ITD so pojavljajo kot ravne igličaste strukture (Nalla in sod., 2005; Porter in sod., 2005; Zavgorodniy in sod., 2008) ali pa imajo obliko ploščic (Porter in sod., 2005; Gotliv in Veis, 2009). Igličasti kristali se pojavljajo v neposredni bližini predentina in najverjetneje zaradi zorenja z oddaljevanjem od tega mesta pridobivajo obliko ploščic (Kinney in sod., 2001). Njihova širina se spreminja glede na lokacijo v zobu, in sicer upada iz kronskega proti apikalnemu delu (Tesch in sod., 2001; Porter in sod., 2005) ter od pulpine votline proti DSM (Xue in sod., 2013). Debelina HA kristalov se glede na položaj ne spreminja dosti, najverjetneje zaradi dejstva, da je omejena s širino kolagenske vrzeli, kjer kristal nastaja (Kinney in sod., 2001), vendar so Märten in sod. (2010) ugotovili, da v kronskem dentinu debelina upada od DSM proti notranjosti (od 3,5 nm v bližini DSM do 2 nm v globokem dentinu). Dolžina HA kristalov v ITD je 109 ± 19,9 nm, ugotovljeno pa je bilo, da v tem delu dentina kristali s svojo *c*-osjo ležijo pravokotno na vzdolžno os DK (Zavgorodniy in sod., 2008), vendar je njihova stopnja urejenosti nizka (Tesch in sod., 2001).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Vzorci dentina

Vzorce dentina smo izrezali iz stalnih, zgornjih sekalcev živali (psov, prašičev, konjev) in ljudi določenih starosti ter naključno izbranih zob Nilskega krokodila (*Crocodylus niloticus*) (tabela 1). Zobje so bili klinično zdravi, brez vidnih znakov kariesa ali drugih obolenj mineraliziranih tkiv.

Za pridobitev zob živali smo od pristojnega urada dobili ustrezna dovoljenja (priložena v prilogi). Sekalce psov smo dobili od živali, evtanaziranih zaradi brezupne napovedi izida zdravljenja. Bolezen ni imela vpliva na mineralizirana zobna tkiva. Zobe smo na Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani izdrli v roku 24 ur. Sekalce prašičev in konjev smo dobili od živali, namenjenih prehrani ljudi in ki so bile zaklane na klavni liniji klavnice Meso Kamnik d.d. (Korenova cesta 9, Podgorje, 1241 Kamnik). Zobe smo izdrli v klavnici 24 ur po zakolu živali. Naključno izbrane zobe krokodila (slika 2) so na Veterinarski fakulteti Univerze v Pretorii v Republiki Južni Afriki izdrli živali, ki je bila usmrčena zaradi neozdravljivega zloma čeljusti. Človeške sekalce smo dobili na Stomatološki kliniki Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Izdrti so bili zaradi brezupne napovedi zdravljenja napredovane parodontalne bolezni.

Slika 2: Krokodilji zobje, uporabljeni v raziskavi. Foto: dr. Gerhard Steenkamp.
Figure 2: Crocodile teeth used in the study. Photo: Dr. Gerhard Steenkamp.

Takoj po izdrtju smo z živčnimi iglami iz pulpinega kanala odstranili organski material. Preostanek organskega materiala smo odstranili tako, da smo zobe za dva dneva potopili v eter in jih 30 minut sušili na zraku. Nato smo jih kuhali v 10% vodikovem peroksidu dve uri in jih čez noč posušili na toplem radiatorju.

Tabela 1: Podatki o vzorcih dentina, vključenih v raziskavo.

Table 1: Data on the dentinal samples used in the study.

	Starost (leta)	Število zob	Tip zob
Pes	3-6	30	zgornji tretji sekalec
Prašič	3-5	30	zgornji tretji sekalec
Konj	10-14	30	zgornji tretji sekalec
Krokodil	3	30	naključno izbrani
Človek	45-58	30	zgornji centralni sekalec

3.1.1 Priprava vzorcev dentina za svetlobno mikroskopijo

10 sekalcev psa, prašiča, konja, krokodila in človeka smo na Inštitutu za anatomijo, histologijo in embriologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani demineralizirali v raztopini Osteosoft® (Osteosoft, Merck KgaA, Darmstadt, Germany), in sicer pasje in krokodilje 22 dni, prašičje in človeške zobe pa 26 dni. Konjske sekalce smo demineralizirali 42 dni v raztopini Osteomoll® (Osteomoll, Merck KgaA, Darmstadt, Germany). Zobe smo razpolovili v bukolingvalni smeri, jih zalili s parafinom, razrezali na 5 µm debele rezine in jih prilepili na objektna stekelca, premazana s premazom APES. Posušene smo barvali s hematoksilinom in eozinom (HE).

3.1.2 Priprava vzorcev dentina za vrstično elektronsko mikroskopijo

Vzorce dentina desetih zob vsake vrste smo na Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani izrezali s turbinskim kolenčnikom (Kavo Mondial, Germany) in diamantnim svedrom (No. 848, Dendia, Feldkirch, Austria). Širina dentinskih vzorcev je bila 3 mm, debelina 1 mm ter višina 4 mm. Vzorce smo izrezali iz zgornje tretjine zobne korenine, pod CSM ter stanjšali iz ustnične in pulpine ter obeh stranskih strani do želene velikosti (slika 3). Vzorce dentina konjskih zob smo izrezali iz področja rezervne krone tik pod epitelnim prirastiščem dlesni. Vzorce smo označili tako, da smo lahko pozneje določili ploskev, obrnjeno proti površini zobne korenine, in stran vzorca, obrnjeno proti zobni kroni. Na

Oddelku za materiale in metalurgijo Naravoslovnotehniške fakultete Univerze v Ljubljani smo dentinske vzorce s stranjo, ki je mejila proti pulpini votlini, navzdol postavili v kalupe in zalili z epoksi smolo (Epofix, Struers, Copenhagen, Denmark) ter pustili polimerizirati čez noč. Izpostavljene prečne preseke dentina smo zbrusili s finimi brusilnimi papirji (MD Plane Grinding Discs, Struers, Copenhagen, Denmark), spolirali na polirni tuhni (MD-Mol Polishing Cloth, Struers, Copenhagen, Denmark), preliti z rdečim lubrikantom za nekovine (DP-Lubricant Red, Struers, Copenhagen, Denmark) ter diamantnim abrazivnim sredstvom (DP-Suspension M, Struers, Copenhagen, Denmark). Postopek poliranja dentinskih vzorcev smo zaključili z osidnim poliranjem na polirni tuhni (OP-Chem Polishing Cloth, Struers, Copenhagen, Denmark) z dodatkom oksidne polirne emulzije (OP- S Suspension, Struers, Copenhagen, Denmark). Vzroce smo nato za 5 minut potopili v ultrazvočno kopel (Bandelin Sonorex GT 120 Transistor, Bandelin Electronics, Germany) s fiziološko raztopino (Komabayashi in sod, 2008) z namenom odstraniti material, ki je ostal na površini vzorca zaradi poliranja in bi kasneje lahko motil analizo (Inoue in sod., 2009). Nato smo jih dehidrirali s 70% etanolom in shranili za 24 ur v desikatorju. V vakuumskem evaporatorju (Vacuum Evaporator, Type JEE-SS, JEOL, Tokyo, Japan) smo na preiskovano površino vzorcev nanesli tanek sloj ogljika. Pri vseh vzorcih smo preiskovali površino, ki je bila obrnjena proti pulpini voltini.

Slika 3: Človeški sekalec in na njem označeno mesto izreza vzorca dentina. Z debelejšo črto je označena ploskev, ki je bila preiskovana. Foto: Nina Mlakar.

Figure 3: A rectangle on a human incisor tooth indicates the area where the dentinal sample was obtained from. The thicker line of the rectangle indicates the investigated dentin sample's surface. Photo: Nina Mlakar.

3.1.3 Priprava vzorcev dentina za fluorescenčno mikroskopijo in elektronsko paramagnetno resonanco

Vzorci dentina za fluorescenčno mikroskopijo (FM) in EPR so izvirali iz istih zob. Začetna priprava je bila enaka kot za elektronsko mikroskopijo. Vzorce smo izrezali iz zgornje tretjine zobne korenine zaradi lastnosti DK, ki so ravno v tem področju najbolj ravni. Vzorce dentina velikosti 1 x 3 x 4 mm smo po dolžini razpolovili z udarcem po ostrem rezilu. Dosledno smo označili stran, ki je bila obrnjena proti kroni zoba in je mejila na prelomljeno ploskev. Na njej so bili DK vzdolžno prerezani. Polovico smo uporabili za FM, polovico za EPR pa smo z diamantnim svedrom, hlajenim z vodnim sprejem, zožali na debelino približno 0,8 mm, in sicer z nasprotne strani od prelomljene ploskve.

Na Institutu Ruđer Bošković v Zagrebu so vzorce za EPR obsevali pri sobni temperaturi na zraku z gama žarki Co^{60} do končne doze 2 MRad.

3.2 Priprava liposomov

Vezikle smo pripravili v Laboratoriju za Biofiziko na Odseku za fiziko trdne snovi Inštituta Jožef Stefan iz jajčnega lecitina in holesterola v molarnem razmerju 4 deli lecitina in 1 del holesterola z metodo tankega lipidnega sloja. Z rotacijskim evaporatorjem smo topilo delno, na oljni rotacijski črpalki pa dokončno izparili. Barvilo kalcein smo vmešali v fosfatno puferirano fiziološko raztopino (PBS, pH= 7,4, osmolarnost približno 280- 290) in pripravili 0,05 mmol raztopino kalceina. Vlili smo jo v stekleno bučko s suhim lipidnim filmom ter ročno stresali, dokler niso bile stene bučke videti čiste. Tako smo pripravili zmes s celotnim razponom velikosti liposomov z ujetim kalceinom.

Za urejanje liposomov po velikosti smo uporabili postopek homogenizacije, t.i. izrivanje oz. ekstruzijo. Približno 1 ml raztopine liposomov smo vsrkali v stekleno brizgo, ki smo jo preko ekstruderja (Lipofast Extruder, Avestin, Ottawa, Canada) povezali z drugo stekleno brizgo. Vzorec smo ekstrudirali skozi serijo polikarbonatnih membran (Nucleopore Corporation, Pleasation, CA) s točno določenim premerom por. Pričeli smo z 800 nm membrano,

nadaljevali s 400 in 200 nm membrano ter končali s 100 nm. Vsako velikosti liposomov smo ekstrudirali 10-krat.

Liposome določenih velikosti smo ločili od prostega fluorescenčnega markerja z 12 urno dializo pri 4°C. Raztopino liposomov smo vbrizgali v dializno kaseto (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA), jo vstavili v raztopino PBS in z magnetnim mešalom zagotovili konstantno rotacijo kasete ter izločanje prostega fluorescenčnega markerja. Po 6 urah dialize smo staro raztopino PBS zamenjali s svežo. Liposome smo nato prelili v stekleničke, ki smo jih ustrezno označene hranili v temnem prostoru na 4°C.

3.3 Svetlobna mikroskopija: potek in naklon dentinskih kanalov glede na vertikalno os skozi središče zobne pulpe (α)

S HE obarvane zobe živali in človeka smo na Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani pregledali pod svetlobnim mikroskopom (Nikon Eclipse E400, Tokyo, Japan). Preiskovali smo osrednji del labialnega dentina zgornje tretjine zobne korenine. Pri 40x povečavi smo opazovali potek DK ter posneli slike poteka pulpinega kanala, pri 100x povečavi pa smo posneli slike poteka DK. Na slednjih smo na vsakem vzorcu posamezne vrste izmerili 12 kotov α, ki so jih DK oklepali glede na vertikalno os skozi središče zobne pulpe.

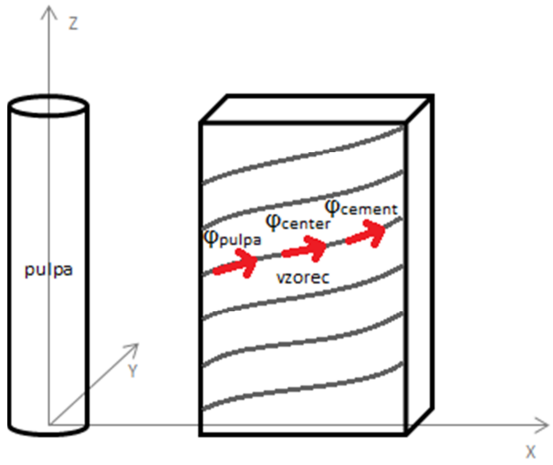
3.4 Fluorescenčna mikroskopija: spremenljivost naklona dentinskih kanalov z razdaljo od pulpinega kanala (δ_{φ})

V laboratoriju za biofiziko na Odseku za fiziko trdne snovi Inštituta Jožef Stefan smo na prelomljeno ploskev dentinskega vzorca z inzulinsko brizgo in iglo nanesli sloj raztopine 100 nm liposomov z ujetim kalceinom. Po 20 minutah smo ostanek raztopine na površini vzorca zbrisali s papirnato brisačko ter vzorec položili na krovno stekelce z obarvano stranjo navzdol. Krovno stekelce smo vstavili v fluorescenčni mikroskop (FM) (Nikon Eclipse TE2000E, Tokyo, Japan).

Kalcein fluorescira med približno 495 in 515 nm valovne dolžine, zato smo na mikroskopu nastavili filtre ekscitacije na 430-490 nm, emisije na 495 nm in dvobarvno zrcalo na 406-594 nm. Čas ekspozicije je bil 0,1 sekunde. Slike smo snemali pri 100 x povečavi in nato sestavili celotno sliko vzorca dentina v programu Paint (Windows 7 Enterprise). Sliko smo v povprečju sestavili iz 30 posnetkov. Zaradi neravnega poteka DK, ki posnemajo obliko podolgovate črke »S« (Kilic in sod., 1997; Muyle in sod., 2001; Costa in sod., 2002; Nanci in Ten Cate, 2008), smo želeli določiti spremenljivost naklona DK z razdaljo od pulpinega kanala. Ta podatek smo kasneje uporabili kot enega izmed parametrov za simulacije spektrov EPR. Kote DK smo merili glede na Z os vzorca (slika 4), in sicer v horizontalni smeri v 3 točkah ter v vertikalni v 4 točkah. Spremenljivost naklona DK z razdaljo od pulpinega kanala (δ_{φ}) smo za vsak vzorec dentina izračunali po formuli:

$$\delta_{\varphi} = \frac{(\varphi_{pulpa} - \varphi_{center}) + (\varphi_{cement} - \varphi_{center})}{2},$$

kjer je φ_{pulpa} naklon DK v področju vzorca, bližje pulpinemu kanalu, φ_{center} naklon DK v osrednjem delu vzorca ter φ_{cement} naklon DK v področju vzorca, bližje DCM. Iz dobljenih vrednosti smo pri vsaki vrsti izračunali povprečne vrednosti spremenljivosti naklona DK glede na naklon v osrednjem delu vzorca z razdaljo od pulpinega kanala.



Slika 4: Shematski prikaz merjenja kotov φ (v področju vzorca, ki je bližje pulpinemu kanalu- φ_{pulpa}, v osrednjem delu vzorca- φ_{center} ter v področju, ki je bližje DCM- φ_{cement}), ki jih DK oklepajo glede na Z os vzorca dentina.

Figure 4: Measurements of the dentinal tubule tilt angles φ (in area closer to pulp canal- φ_{pulpa}, in central area of dentin sample- φ_{center} and in area closer to dentino- cemental junction- φ_{cement}) towards Z axis of the dentinal sample.

3.5 Vrstična elektronska mikroskopija: mikrostrukturiranost dentina

Mikrostrukturo dentina smo na Oddelku za metale in metalurgijo Naravoslovnotehniške fakultete Univerze v Ljubljani opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (JEOL JSM-5610, JEOL, Tokyo, Japan) pri 10 kV in z načinom povratnega sipanja elektronov. Na vsakem vzorcu dentina smo pri določeni povečavi posneli 10 slik, in sicer za število DK na mm^2 pri 1000 x povečavi ter za meritve premera DK in širine PTD pri 6000 x. V načinu povratnega sipanja elektronov lahko pridobimo informacijo o mineraliziranosti dentina, saj razlike intenzivnosti in kontrasta na sliki odražajo število elektronov, ki se odbijejo od tarče oz. delež elementov z višjim atomskim številom. Elementi z višjim atomskim številom so na sliki svetlejši, z nižjim pa temnejši (Lloyd, 1987). Z vrstičnim elektronskim mikroskopom z energijsko disperzijskim spektrometrom rentgenskih žarkov so v preteklosti že dokazali, da je v dentinu obroč PTD svetlejši od okolnega ITD zaradi signifikantno višje vsebnosti kalcija in fosforja (Kodaka in sod., 1991).

Za analizo slik smo uporabili program ImageJ (ImageJ 1.45s, Image processing and analysis in Java 1.6.7_20, Bethesda, MD, USA). Iz slik, narejenih pri 1000 x povečavi, kjer je velikost vidnega polja 12238 μm^2, smo prešteli število DK. Število DK na periferiji slik, ki niso bili posneti v celoti, smo razpolovili in jih prišteli ostalim DK ter nato izračunali povprečje DK na mm^2 po formuli:

$$\textit{število DK / } mm^2 \textit{ = (povprečje števila DK /12238 } \mu m^2\textit{) x 81713.} \quad (1)$$

Premer DK (R_{DK}) ter premer DK s PTD (R_{DK+PTD}) smo izmerili DK s PTD, ki so bili v celoti ujeti na sliko, posneto pod 6000 x povečavo (slika 5A). Ker so bili nekateri DK in PTD nekoliko ovalne oblike, smo pri njih merili premer skozi ožji del s predpostavko, da so DK ter PTD okoli njih okrogli in lahko potekajo pod različnimi koti. Vrednosti vseh premerov smo nato razpolovili in tako dobili polmere DK (r_{DK}) ter polmere DK s PTD (r_{DK+PTD}). Ploščino DK (p_{DK}) vseh preiskovanih vrst smo izračunali po formuli:

$$p_{DK} = \pi\, r_{DK}^2. \quad (2)$$

Ploščino PTD (p_{PTD}) smo za vse vrste, razen konja in krokodila, izračunali po formuli:

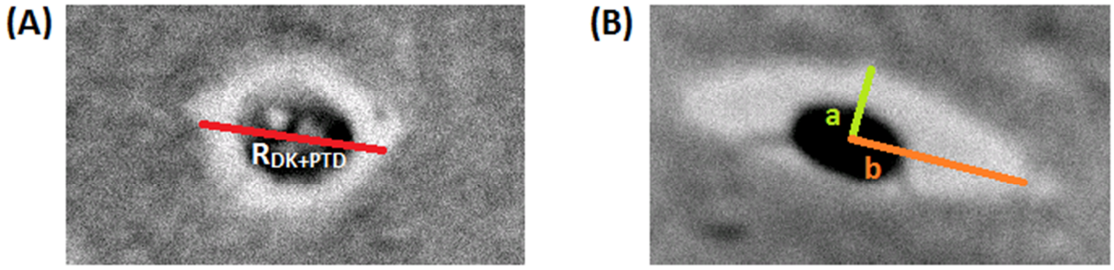
$$p_{DK+PTD} = \pi\, r_{DK+PTD}^2, \quad (3)$$

$$p_{PTD} = p_{DK+PTD} - p_{DK.} \quad (4)$$

Pri konju, kjer je bil PTD naložen asimetrično okoli DK (slika 5B), smo izmerili njegovo širino skozi širši in ožji del. Ploščino PTD ($p_{PTD(k)}$) smo izračunali po formuli:

$$p_{DK+PTD(k)} = \pi\, a\, b, \quad (5)$$

$$p_{PTD(k)} = p_{DK+PTD(k)} - p_{DK.} \quad (6)$$



Slika 5: Dentinski kanal s pripadajočim PTD v (A) dentinu prašiča in (B) dentinu konja. Z rdečo črto je označen premer DK s PTD (A), s črkama a in b pa sta označena polmera elipse, s pomočjo katerih smo izračunali ploščino PTD (B).

Figure 5: Dentinal tubule with PTD in porcine (A) and equine dentin (B). Red line indicates the diameter of the dentinal tubule with peritubular dentin (A); letters a and b indicate radiuses of an ellipse based on which the surface area of PTD was calculated (B).

Deleže PTD in ITD smo izračunali za vsako sliko posebej, saj je število DK na posameznih slikah variiralo. Iz vseh slik skupaj smo nato izračunali povprečne vrednosti deležev PTD in ITD. Velikost vidnega polja pri 6000 x povečavi je bila 336 µm^2.

$$p_{ITD} = 336\ \mu m^2 - p_{PTD+DK} \times \text{število DK}, \quad (7)$$

$$\text{delež}_{ITD} = p_{ITD} / 336\ \mu m^2, \quad (8)$$

$$\text{delež}_{PTD} = p_{PTD} \times \text{število DK} / 336\ \mu m^2. \quad (9)$$

3.6 Merjenje spektrov elektronske paramagnetne resonance

Merjenje spektrov EPR smo opravili v Laboratoriju za biofiziko na Odseku za fiziko trdne snovi Inštituta Jožef Stefan. Da bi določili orientacijo HA kristalov, smo vsak vzorec dentina, ki je vseboval paramagnetne centre, na tri različne načine pritrdili na teflonski nosilec. Nosilec smo pritrdili na goniometer in stran z vzorcem, obrnjeno vedno v isto smer, vstavili v EPR spektrometer (Bruker Elexsys E500 X-band Spectrometer). Spektre smo merili pri naslednjih pogojih: srednja vrednost magnetnega polja 336,5 mT, pregledano območje magnetnega polja 5 mT, frekvenca mikrovalov 9,356- 9,359 GHz, moč 10 mW, čas snemanja 21 s, 100 kHz modulacija z amplitudo 0,1 mT, časovna konstanta filtriranja 21 ms, sobna temperatura. Vzorec smo z goniometrom vrteli okoli daljše osi teflonskega nosilca ter tako

spreminjali kot, ki ga je vzorec oklepal glede na magnetno polje. Vzorec smo vrteli v korakih po 9°, od začetne postavitve vzorca in do 180°, torej smo med vsako rotacijo vzorca posneli po 21 spektrov. Nato smo spremenili položaj vzorca na nosilcu tako, da smo posneli EPR pri rotacijah okoli vseh treh glavnih osi vzorca (X, Y in Z), torej smo skupno izmerili 63 spektrov. Vse spektre smo shranili v digitalni obliki.

Iz EPR meritev smo z analizo oblike spektrov določili preferenčno smer ureditve HA kristalov v vzorcih dentina, delež urejenih kristalov pa smo nato določili s simulacijami spektrov.

3.7 Računalniško modeliranje spektrov elektronske paramagnetne resonance

Računalniško modeliranje spektrov EPR smo opravili v Laboratoriju za biofiziko na Odseku za fiziko trdne snovi Inštituta Jožef Stefan. S primerjavo izračunanih in simuliranih spektrov smo želeli določiti smer ureditve HA kristalov v vzorcih dentina ter oceniti delež urejenih HA kristalov, do česar smo prišli v naslednjih korakih:

1. Pri vsaki kombinaciji vrednosti iskanih parametrov smo sestavili prostorsko porazdelitev smeri HA kristalov v modelnem vzorcu. (Pri tem smo preizkusili različne opise geometrije, zato so bili tudi parametri v različnih modelih različni.)
2. Iz porazdelitve smeri HA kristalov smo za vsako usmeritev vzorca glede na magnetno polje izračunali porazdelitev resonančnih polj, pri katerih bi vzorec absorbiral mikrovalovno obsevanje, ter s pomočjo znane osnovne oblike EPR absorpcijske črte nato izračunali obliko spektrov EPR pri vseh merjenih legah glede na magnetno polje.
3. Izračunane spektre smo končno primerjali z izmerjenimi in ocenili ujemanje.
4. Opisani postopek (1–3) smo ponovili za različne kombinacije iskanih parametrov in izmed njih izbrali vrednosti z najboljšim ujemanjem izmerjenih in izračunanih spektrov.

3.7.1 Prostorska porazdelitev smeri hidroksiapatitnih kristalov

Porazdelitev smeri HA kristalov smo sestavljali iz prispevkov neurejenih in urejenih kristalov. Delež slednjih v skupni porazdelitvi je bil glavni iskani parameter simulacij.

Naključno razporeditev neurejenih kristalov v vse smeri opisuje verjetnostna porazdelitev $P \propto \sin(\vartheta)$, kjer je ϑ kot proti poljubni izbrani smeri v prostoru.

Opis urejenih kristalov smo v iskanju najboljšega ujemanja s poskusi nekajkrat spremenili; v nadaljevanju opisujemo le najpomembnejše korake v razvoju modela.

3.7.1.1 Model 1: Diskretna porazdelitev hidroksiapatitnih kristalov pod kotom glede na lokalno smer dentinskih kanalov

V prvem poskusu modela smo sledili začetni hipotezi, da je del HA kristalov usmerjen radialno glede na lokalno smer DK. Po rezultatih iz svetlobne mikroskopije ter FM smo zgradili prostorski model DK. Ker se kot, ki ga DK oklepajo glede na vertikalno os skozi središče zobne pulpe, spreminja v koronoapikalni smeri (Muylle in sod., 2002; Nanci in Ten Cate, 2008) in je gostota DK v bližini pulpine votline višja kot na periferiji dentina (Chu in sod., 2010), smo vzorce izrezali iz srednjega dela dentina v zgornji tretjini koreninskega dela zoba. Tu je njihov potek glede na vertikalno in horizontalno os najbolj raven, hkrati pa smo tako lahko zanemarili večja odstopanja v gostoti DK. Predpostavili smo, da so poteki DK glede na pulpo dokaj cilindrično simetrični in glede na geometrijske podatke (dimenzije vzorcev dentina, njihove oddaljenosti od pulpine votline, koti DK glede na X os v ravnini XZ) ter postavitev vzorca najprej izračunali oz. predvideli pogostnosti lokalnih smeri DK v smeri proti Y osi v ravnini XY. V vsaki točki prostorskega modela smo nato HA kristale uredili pod določenim kotom β (dodatni iskani parameter) simetrično okoli lokalne smeri DK.

Ker se simetrija tako dobljenih kristalov ni ujemala z osnovnimi ugotovitvami analize oblike spektrov (podrobneje opisano v poglavju 4.4.2), smo model zelo hitro opustili in nadaljevali z razvojem modela z zveznimi porazdelitvami.

3.7.1.2 Model 2: Zvezna porazdelitev hidroksiapatitnih kristalov v ravnini dentinski kanali-pulpa

V naslednjem modelu smo preferenčno smer kristalov omejili v ravnino, ki zajema DK in pulpo. Hkrati smo nekoliko zmanjšali tudi stopnjo urejenosti. Verjetnostno porazdelitev preferenčno urejenega dela kristalov smo v tem primeru opisali s funkcijo:

$$P(\vartheta) \propto \sin(\vartheta)\ \mathrm{Exp}(a\ (\cos(\vartheta))^2)\ ,$$

kjer je ϑ kot smeri HA kristalov proti preferenčni smeri urejenosti. Odklon le-te od pravokotnice na lokalno smer DK je predstavljal iskani parameter ϑ_{SIM}. Parameter a določa stopnjo urejenosti in smo ga izbrali tako, da je bil njegov učinek na spekter največji (a = 4).

3.7.1.3 Model 3: Zvezna porazdelitev hidroksiapatinih kristalov vzdolž pulpe

V zadnjem modelu smo opustili povezavo urejanja HA kristalov glede na smeri DK- preferenčna smer urejanja je bila tako po celotnem vzorcu enotna. Obliko verjetnostne porazdelitve smo prevzeli od Modela 2, le da je parameter ϑ_{SIM} zdaj opisoval odklon preferenčne smeri urejanja od Z osi. Popravki preferenčne smeri niso bili potrebni ali so bili v okviru natančnosti postavitve vzorca na nosilec (± 10°).

3.7.2 Izračun spektrov elektronske paramagnetne resonance

V naslednjem koraku smo iz porazdelitve po usmeritvah kristalov določili porazdelitev po resonančnih poljih. Le-ta so za vsako usmeritev kristala proti smeri magnetnega polja določena po enačbi:

$$B_{res} = \frac{g_0\, B_0}{\sqrt{g_\perp^2\, sin^2\ \psi + g_{II}^2\, cos^2\ \psi}}\ ,\quad cos\,\psi = \frac{\overrightarrow{B_0}}{B_0} \cdot \begin{pmatrix} sin\,\vartheta\, cos\,\beta \\ cos\,\vartheta\, cos\,\beta \\ cos\,\vartheta \end{pmatrix},$$

kjer je B_0 srednja vrednost magnetnega polja in znaša 336,5 mT, g_0 Zeemanov sklopitveni faktor za prosti elektron in znaša 2,0023, $g_\perp$ in g_{II} komponenti aksialno simetričnega

Zeemanovega sklopitvenega tenzorja, ψ kot med smerjo magnetnega polja in smerjo HA kristalov ter ϑ in β kota smeri HA kristala proti osema Z oz. X.

Končno obliko spektra EPR smo za vsako lego vzorca glede na magnetno polje dobili po konvoluciji ustrezne porazdelitve resonančnih magnetnih polj z obliko resonančne krivulje (odvod Lorentzove absorbcijske krivulje s širino W = 0,18 mT).

3.7.3 Primerjanje izračunanih spektrov z izmerjenimi

Vse izračunane spektre (NS = 63) smo na koncu primerjali z izmerjenimi. Pri tem smo uporabili uveljavljeno metodo normiranega reduciranega c2, ki sešteje kvadrate odstopanj simuliranega ($y^{(sim)}$) od izmerjenega signala ($y^{(exp)}$) po vseh merskih točkah (NB = 128):

$$\chi^2 = \frac{1}{\sigma^2 N_S N_B} \sum_{i=1}^{N_S} \sum_{j=1}^{N_B} \left(y_{i,j}^{(sim)} - y_{i,j}^{(\exp)} \right)^2 .$$

Vrednosti c2 so normirane na standardno deviacijo merskega šuma s. Manjša vrednost χ^2 pomeni boljše ujemanje izračunanih spektrov z izmerjenimi in s tem večjo zanesljivost parametrov.

3.7.4 Filtriranje rezultatov

V vsakem vzorcu dentina posebej smo želeli ugotoviti, kolikšen je delež HA kristalov, ki so urejeni proti preferenčni smeri oz. so naključno razporejeni. S simulacijami smo prečesali široko območje vrednosti iskanega parametra (d_z). Pri določanju najboljše vrednosti in negotovosti za posamezen parameter smo sestavili histogram verjetnosti, utežen glede na ujemanje spektrov (χ^2) in določili njegovo težišče ter deviacijo. Na koncu smo za primerjavo med preiskovanimi vrstami povprečili vse vzorce iste vrste.

3.8 Statistično vrednotenje rezultatov

3.8.1 Svetlobna mikroskopija

Podatki o naklonu DK glede na vertikalno os skozi središče zobne pulpe so predstavljeni kot povprečja ± standardni odklon od povprečja (SD). Izračunali smo koeficient variacije (CV) za ponovitve meritev naklonov DK:

$$CV = SD / povpr. \times 100\%$$

Razlike naklonov DK med vrstami smo primerjali z neparametrično Kruskal-Wallisovo analizo variance na rangih (Kruskal Wallis Analysis of variance on ranks). V primeru statistično značilne razlike med skupinami, smo rezultate parov skupin primerjali z neparametričnim Tukey-evim testom. P vrednost < 0,05 je bila merilo za statistično značilnost. Za vse zgoraj omenjene analize smo uporabili statistični program SigmaPlot 11.0 (SYSTAT Software Inc.).

3.8.2 Vrstična elektronska mikroskopija

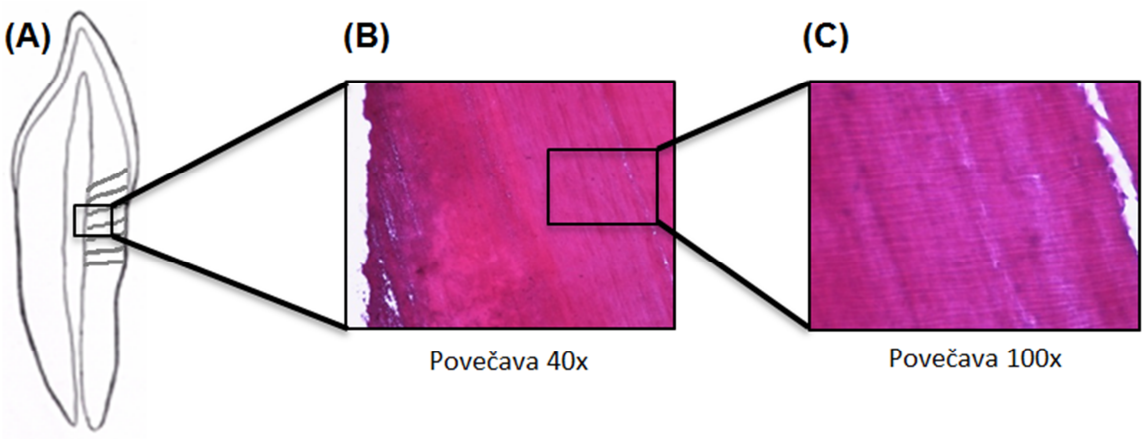
Podatki o parametrih dentina preiskovanih vrst (število DK na mm^2, premer DK, širina PTD, površina PTD in ITD) so predstavljeni kot povprečja ± SD. Razlike med parametri dentina preiskovanih vrst (pes, prašič, konj, krokodil in človek) smo pri normalni porazdelitvi podatkov in enakosti varianc med skupinami primerjali s parametrično analizo variance (One way analysis of variances), v primeru ko pa porazdelitev podatkov ni bila normalna ali so se variance med skupinami razlikovale, smo uporabili neparametrično Kruskal-Wallisovo analizo variance na rangih (Kruskal Wallis Analysis of variance on ranks). V primeru statistično značilne razlike med skupinami smo rezultate parov skupin primerjali s parametrično Holm-Sidakovo metodo oziroma neparametričnim Dunn-ovim testom.

P vrednost < 0,05 je bila merilo za statistično značilnost. Za vse zgoraj omenjene analize smo uporabili statistični program SigmaStat 3.5 (SYSTAT Software Inc.).

4 REZULTATI

4.1 Svetlobna mikroskopija: potek ter naklon dentinskih kanalov glede na pulpin kanal (α)

Mikrostruktura dentina preiskovanih vrst je bila podobna. Dentin je bil v celoti prepreden s številnimi DK, ki so potekali od pulpine votline oz. pulpinega kanala proti DSM oz. DCM. V zgornji tretjini koreninskega dentina so DK izstopali v zobno pulpo bolj apikalno kot na površini zoba (slika 6). Izračunane mediane vrednosti naklona DK z odstopanji so predstavljene na sliki 7.

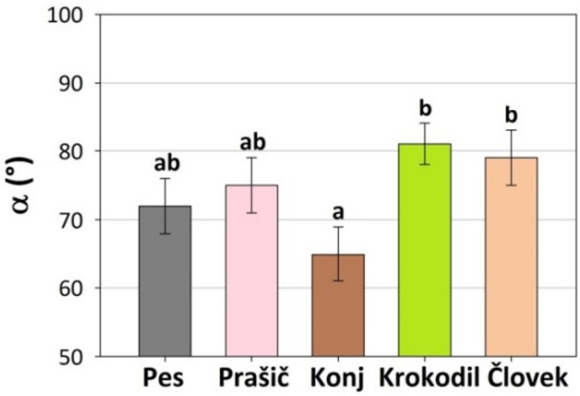


Slika 6: Merjenje naklona dentinskih kanalov glede na vertikalno os skozi središče zobne pulpe. (A) Shematski prikaz sekalca s potekom posameznih DK in na njem označeno preiskovano mesto. (B) Pod 40x povečavo je jasno viden potek pulpinega kanala, (C) pod 100x povečavo pa so vidni poteki DK.

Figure 6: Measurement of tilt angles of dentinal tubules relative to the vertical axis of the dental pulp. (A) A rectangle on a schematic drawing of an incisor tooth represents the investigated site, with individual dentinal tubules marked. (B) A border between root canal and dentin is visualized under the magnification of 40x. (C) Higer magnification (100x) is used to clearly demonstrate individual dentinal tubules.

Koeficient variacije za ponovljivost meritev naklona DK med vzorci dentina krokodila je bil najnižji in je znašal 4%, sledil mu je KV človeka in psa (5%) ter prašiča in konja (6%).

Absolutni naklon DK v vzorcih konja (65° ± 4) je bil statistično značilno nižji kot v vzorcih krokodila ($P < 0,05$) in človeka (79° ± 4), med ostalimi vrstami (pes 72° ± 4, prašič 75° ± 4) pa ni bilo statistično značilnih razlik v naklonu DK ($P > 0,05$).

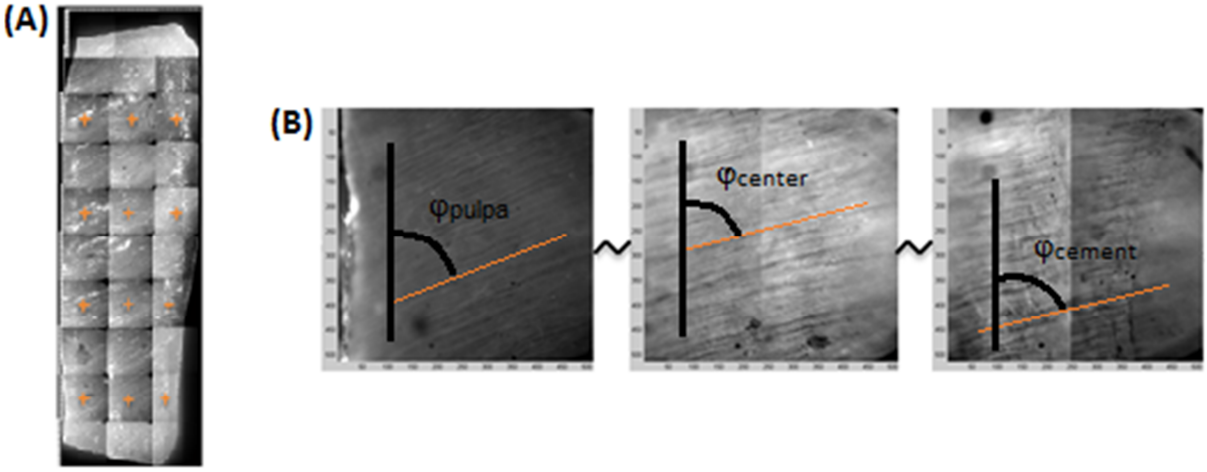


Slika 7: Naklon DK (α) živalskih vrst in človeka glede na vertikalno os skozi središče zobne pulpe. Višina stolpcev označuje povprečno vrednost, daljice pa SD. Različne črke nad daljicami označujejo statistično značilno razliko ($P < 0,05$).

Figure 7: Tilt angles of dentinal tubules (α) relative to the vertical axis of the dental pulp in animals and human. Height of the columns indicates mean values, bars indicate SD. Letters above bars indicate significant difference between the species ($P < 0,05$).

4.2 Fluorescenčna mikroskopija: spremenljivost naklona dentinskih kanalov z razdaljo od pulpinega kanala (δ_{φ})

Naklon DK se z razdaljo od pulpinega kanala ni spreminjal veliko. V vzorcih dentina psa se je naklon DK od sredine proti periferiji v povprečju spustil za 1°, v dentinu konja za 5° (slika 8) in v dentinu človeka za 2°. V dentinu prašiča se naklon DK ni spreminjal, medtem ko se je v dentinu krokodila dvignil za 1°.



Slika 8: Spremenljivost naklona DK z oddaljenostjo od pulpinega kanala. (A) Sestavljena slika vzorca dentina konja z označenimi mesti, kjer smo merili naklone DK. (B) Merjenje naklona DK z oddaljenostjo od pulpinega kanala (povečava 100x).

Figure 8: Alternation of dentinal tubule tilt angle with the distance from the root canal. (A) Marked areas on a picture of a horse dentinal sample indicate areas where dentinal tubule tilt angles were measured from. (B) Measurements of dentinal tubule tilt angle with the distance from the root canal (magnification 100x).

4.3 Vrstična elektronska mikroskopija: mikrostrukturiranost dentina

Mikrostrukturiranost prečnih prerezov dentina pasjih, prašičjih, konjskih in človeških zob je bila podobna (slika 9 A-F, I-J). Dokaj dobro omejen obroč svetlejšega PTD je obkrožal črne DK. Meja med PTD in ITD je bila najizrazitejša v dentinu konja, vendar tudi tu ni bila ostro omejena. Njena izrazitost je nato bledela od dentina prašiča proti psu in človeku.

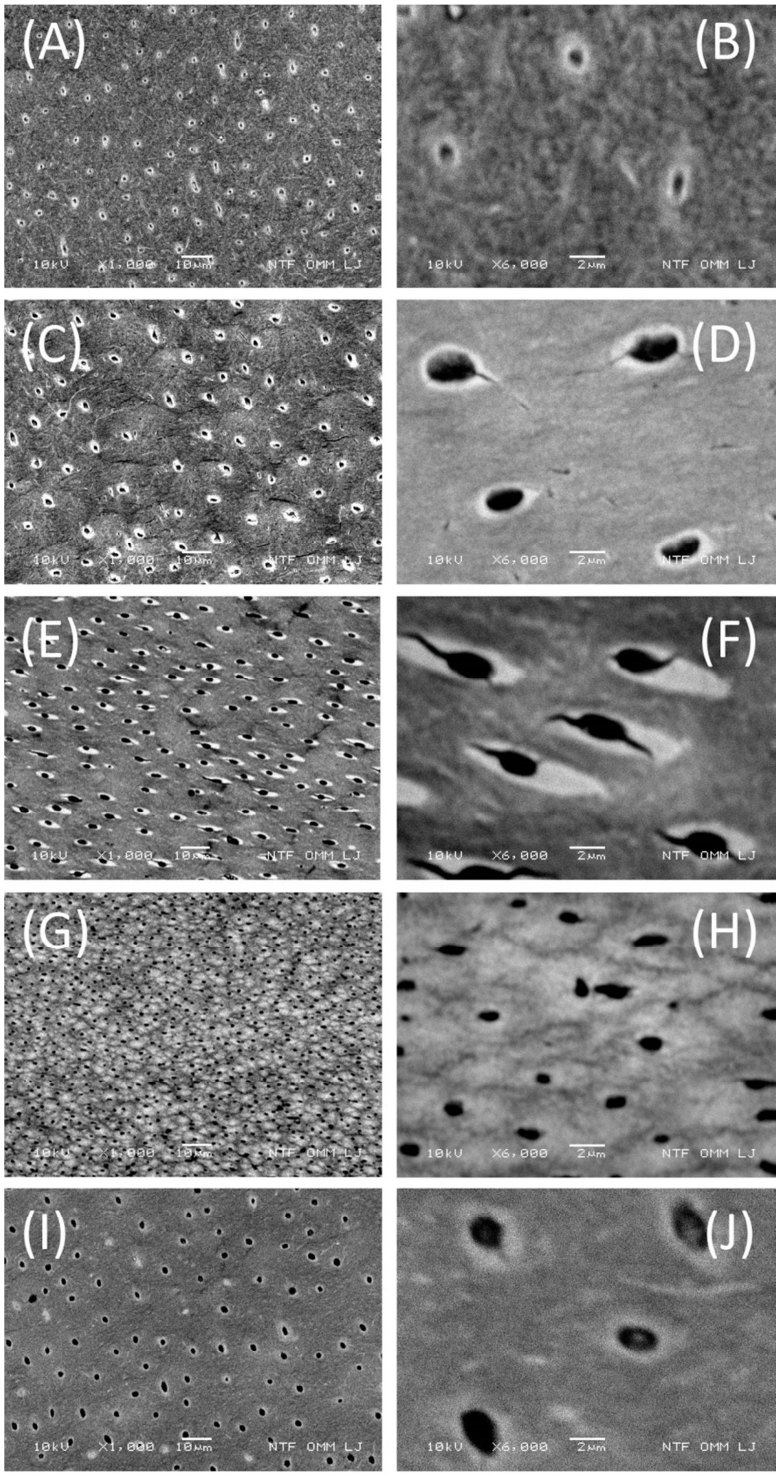
Dentinski kanali so bili pri vseh preiskovanih vrstah v dentinu korenine naključno razporejeni; mestoma je izgledalo, kot bi se združevali v različno velike skupine, kjer so ležali tesneje skupaj, mestoma pa so ležali solitarno. Večina DK v vzorcih psa in človeka je bila okrogle oblike, medtem ko so bili DK v dentinu prašiča in konja bolj ovalne oblike.

Prašič in človek sta imela dokaj enakomerno velike premere DK. V dentinu psa, prašiča in konja smo opazili še posamezne manjše DK (kanalikule), premera približno do ¼ premera glavnega DK, ki jih je prav tako obkrožal pas PTD. Pri konju so bili v pas PTD ujeti tudi do trije kanalikuli.

Pri psu, prašiču in človeku je PTD enakomerno, v obliki prstana obdajal DK, medtem ko je bil v vzorcih dentina konja ovalne oblike (slika 9 E-F). Pri njem se je razširjal okoli DK v koronoapikalni smeri, v interdentalni smeri je bil tanjši. Večina DK je pri konju izhajala iz središča PTD, nekateri pa so v njem ležali ekscentrično.

Površina ITD je bila proti PTD precej neravna, posebej pri psu, medtem ko je imel ITD pri prašiču najbolj gladek videz.

Mikrostruktura dentina krokodila se je precej razlikovala od ostalih preiskovanih vrst (slika 9 G-H). DK so bili večinoma ovalni, nekateri celo nepravilnih oblik, njihova velikost je variirala. Okoli DK ni bilo dobro definiranega obroča PTD, saj so bila težišča svetlejših območij naključno razporejena proti težiščem DK. Zaradi tega v dentinu krokodila nismo merili širine PTD ter računali njegove površine in površine ITD.



Slika 9: Posnetki prečnih prerezov vzorcev dentina psa (A, B), prašiča (C, D), konja (E, F), krokodila (G, H) in človeka (I, J). Posnetki A, C, E, G in I so posneti pri 1000x, B, D, F, H in J pa pri 6000x povečavi.

Figure 9: Scanning electron microscopy images of cross sections of dentinal samples from a dog (A, B), pig (C, D), horse (E, F), crocodile (G, H) and human (I, J). Images A, C, E, G and I were obtained at magnification of 1000x and B, D, F, H and J at magnification of 6000x.

Med vzorci dentina različnih vrst smo opazili razlike v številu DK na mm^2, premeru DK, širini PTD ter deležu PTD in deležu ITD (tabela 2). Pri analizi mikrostrukturnih parametrov smo ugotovili največjo podobnost med dentinom prašiča in človeka; pri nobenem parametru med njima namreč ni bilo statistično značilnih razlik ($P > 0,05$). Nadalje smo ugotovili, da je bilo število DK na mm^2 v dentinu krokodila statistično značilno višje kot pri ostalih vrstah ($P < 0,05$), med slednjimi pa ni bilo statistično značilnih razlik ($P > 0,05$). Premer DK se med dentinom psa in krokodila ni statistično značilno razlikoval ($P > 0,05$), je pa bil pri obeh statistično značilno nižji kot pri ostalih vrstah ($P < 0,05$). V dentinu psa sta bila tudi širina in delež PTD statistično značilno nižja ($P < 0,05$), posledično pa je bil delež ITD statistično značilno višji v primerjavi z ostalimi vrstami ($P < 0,05$). Širina in delež PTD sta bila v dentinu konja statistično značilno večja ($P < 0,05$), medtem ko je bil delež ITD statistično značilno nižji kot pri ostalih vrstah ($P < 0,05$).

Tabela 2: Mikrostrukturne karakteristike dentina psa, prašiča, konja, krokodila in človeka.

Table 2: Microstructural characteristics of canine, porcine, equine, crocodile and human dentin.

	Število DK (mm^{-2})	Premer DK (µm)	Širina PTD (µm)	Površina PTD (%)	Površina ITD (%)
Pes	10 000 ± 1500 [a]	0,7 ± 0,1 [a]	0,5 ± 0,1 [a]	1,9 ± 0,5 [a]	97,6 ± 0,6 [a]
Prašič	13 000 ± 6000 [a]	1,3 ± 0,2 [b]	0,7 ± 0,2 [b]	5 ± 1 [b]	94 ± 2 [b]
Konj	17 000 ± 6500 [a]	1,1 ± 0,2 [b]	0,9 ± 0,2 [c]	11 ± 3 [c]	86 ± 4 [c]
Krokodil	68 000 ± 3000 [b]	0,6 ± 0,0 [a]	-	-	-
Človek	10 500 ± 1500 [a]	1,4 ± 0,3 [b]	0,7 ± 0,1 [b]	6 ± 1 [b]	93 ± 2 [b]

Legenda: DK, dentinski kanali; PTD, peritubularni dentin; ITD, intertubularni dentin. Rezultati z različnimi nadpisanimi črkami v stolpcu se statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$).

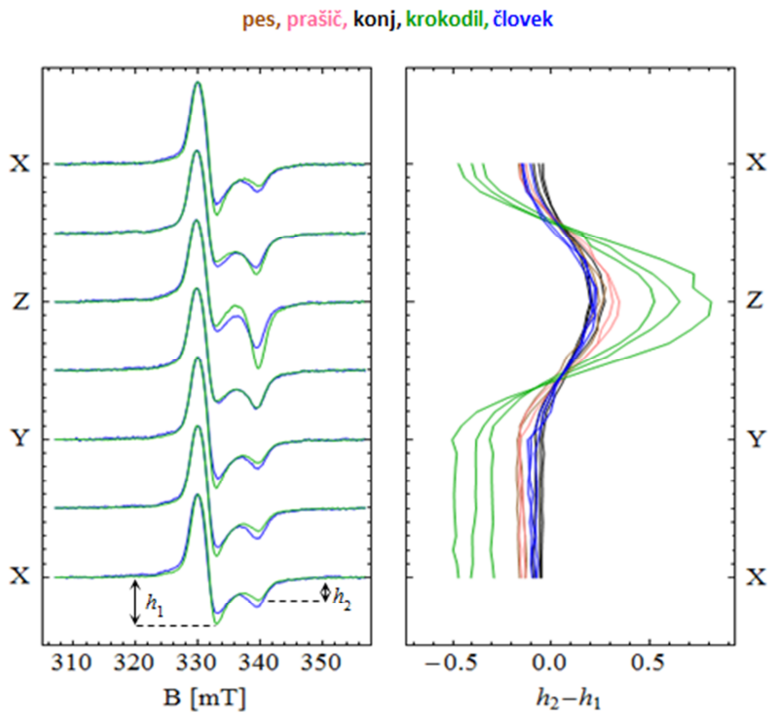
Legend: DK, dentinal tubules; PTD, peritubular dentin; ITD, intertubular dentin. Letters indicate significant difference between the species ($P < 0,05$).

4.4 Elektronska paramagnetna resonanca

4.4.1 Vrednosti Zeemanovega sklopitvenega tenzorja ter analiza oblike spektra elektronske paramagnetne resonance

Komponenti aksialno simetričnega Zeemanovega sklopitvenega tenzorja sta znašali $g_{\perp}$ = 2,004 in g_{II} = 1,999.

Pri rotaciji vzorcev dentina okoli osi X (v ravnini Z → Y) ter okoli osi Y (X → Z) se je oblika spektrov EPR spreminjala, kar pomeni, da se je spreminjala tudi relativna smer HA kristalov proti magnetnemu polju, medtem ko se pri rotaciji okoli osi Z (v ravnini X → Y) spektri EPR niso spreminjali in je bila torej relativna smer HA kristalov glede na smer magnetnega polja ista (slika 10). Ker je os Z vzorcev dentina vzporedna s pulpinim kanalom oz. z vertikalno osjo zoba, to pomeni, da *c*-osi preferenčno urejenih HA kristalov v dentinu koreninskega dela zoba vseh preiskovanih vrst ležijo cilindrično-simetrično glede na pulpin kanal oz. vertikalno os zoba.

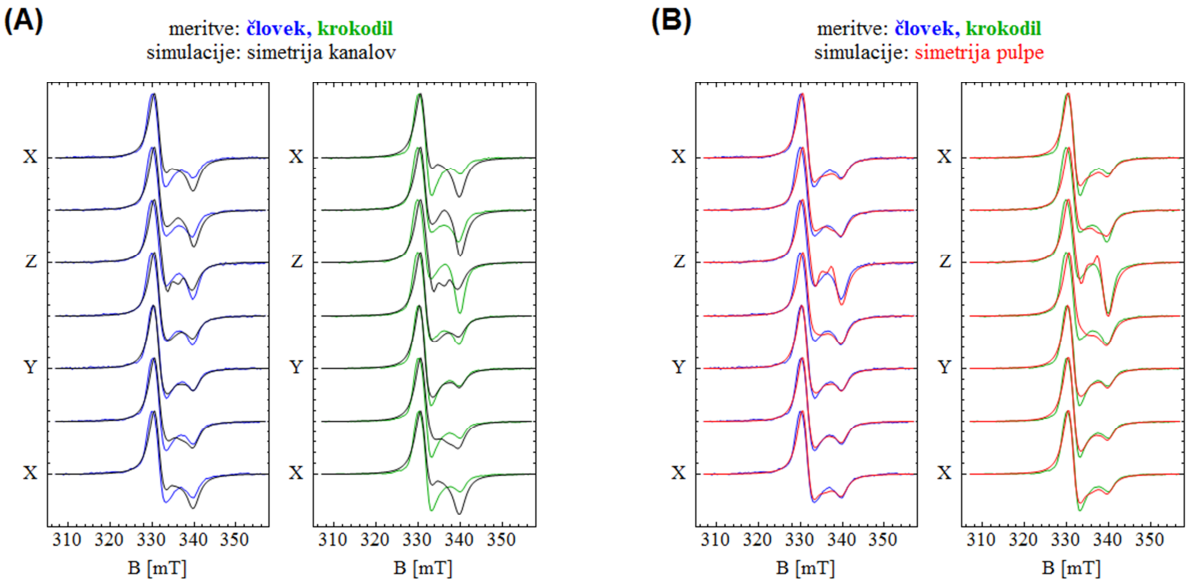


Slika 10: Posneti spektri EPR v odvisnosti od lege vzorca glede na magnetno polje (leva slika)- X, Y in Z označujejo osi vzorca, ki so bile med snemanjem spektra vzporedne z magnetnim poljem; zaradi lažje preglednosti so prikazani le spektri enega vzorca dentina krokodila (zelena črta) in človeka (modra črta). h_1 in h_2 označujeta globini prvega oz. drugega minimuma normiranih spektrov (višina vseh spektrov = 1), ki sta odvisni od relativne smeri HA kristalov glede na zunanje magnetno polje. Njuna razlika (desna slika) pregledneje prikaže občutljivost spektrov EPR na rotacije okoli različnih osi vzorcev: oblika spektra se za vse vzorce izrazito spreminja pri rotacijah X → Z (okoli osi Y) ter Z → Y (okoli osi X), pri rotaciji Y → X (okoli osi Z) pa ostaja podobna, kar pomeni, da so HA kristali urejeni cilindrično-simetrično glede na smer pulpinega kanala.

Figure 10: Recorded EPR spectra relative to position of a dentinal sample towards the magnetic field (left picture) - X, Y and Z indicate sides of samples parallel to magnetic field; only spectra from one crocodile sample (green line) and one human sample (blue line) are shown. h_1 and h_2 indicate depths of the first and second minimum of normalized spectra (height of all spectra is 1) and are dependent on a relative direction of hydroxyapatite crystals relative to external magnetic field. Their difference (right picture) shows sensitivity of EPR spectra to rotations around different axes of samples; the shape of spectra changes with rotations X → Z (around Y axis) and Z → Y (around X axis) but remains same with rotation Y → X (around Z axis)- hydroxyapatite crystals are cylindrically symmetric to the root canal.

4.4.2 Simulacije spektrov elektronske paramagnetne resonance

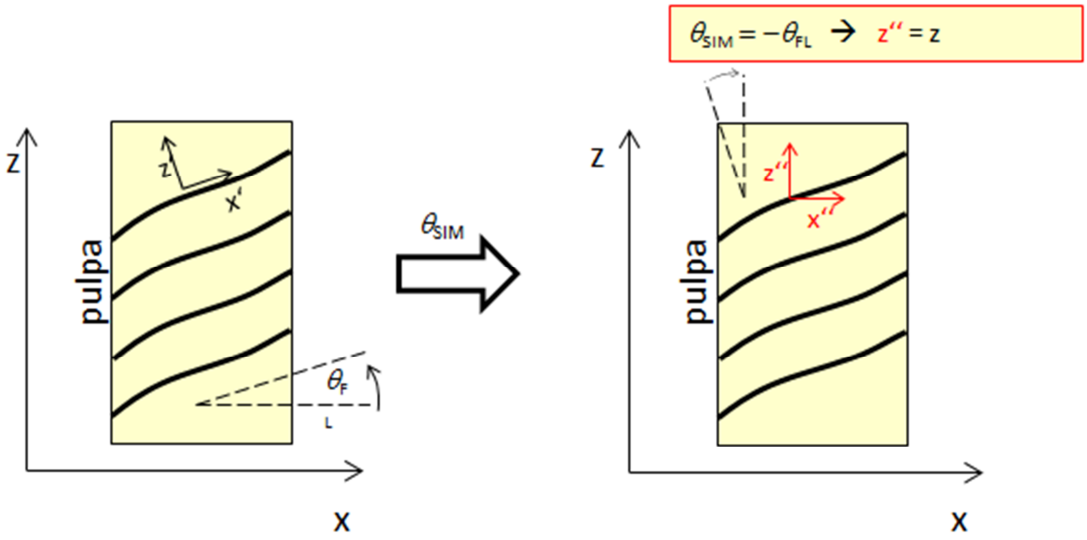
Iz analize oblike spektrov smo ugotovili, da so *c*-osi HA kristalov v vzorcih dentina preferenčno urejene vzdolž vertikalne osi zoba oz. pulpinega kanala, kar so potrdile tudi simulacije spektrov (slika 11).



Slika 11: Primerjava izmerjenih in izračunanih spektrov EPR kotnih odvisnosti postavitve vzorca dentina. (A) Izmerjeni (modra črta dentin človeka, zelena črta dentin krokodila) in izračunani spektri modela simetrije ureditve *c*-osi HA kristalov pravokotno na DK (siva črta) se ne ujemajo, medtem ko se (B) izmerjeni (modra črta dentin človeka, zelena črta dentin krokodila) in izračunani spektri modela simetrije ureditve *c*-osi HA kristalov vzporedno z osjo pulpinega kanala (rdeča črta) lepo ujemajo.

Figure 11: Comparison of measured and calculated EPR spectra relative to position of a dentinal sample. (A) Measured (blue line indicates human dentin and green line indicates crocodile dentin) and calculated spectra simulated to symmetry of dentinal tubules (grey line) do not correspond while (B) measured (blue line indicates human dentin and green line indicates crocodile dentin) and calculated spectra simulated to symmetry of pulp canal (red line) correspond well.

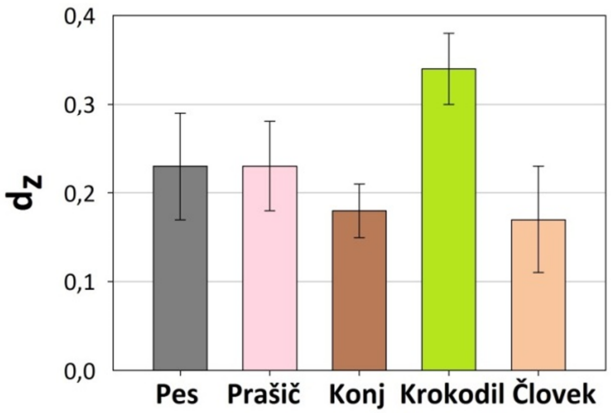
Rezultati modela 2, kjer so bili HA kristali preferenčno urejeni glede na DK, so namreč pokazali, da je bilo ujemanje izračunanih in izmerjenih spektrov najboljše, če smo preferenčno smer urejanja HA kristalov glede na DK nagnili za določen kot ϑ_{SIM} (slika 12). Velikost tega kota je bila pri vseh vzorcih skoraj natančno nasprotno enaka povprečnemu naklonu DK glede na smer pulpinega kanala (ϑ_{FL}), kar pomeni, da je bila preferenčna smer urejenega deleža kristalov skoraj natančno vzporedna z osjo pulpinega kanala.



Slika 12: Ujemanje izračunanih in izmerjenih spektrov EPR je najboljše, če preferenčno smer HA kristalov glede na DK nagnemo za kot ϑ_{SIM}, ki je nasprotno enak povprečnemu naklonu DK glede na smer pulpinega kanala.

Figure 12: Calculated and measured EPR spectra fit if preferred HA dirrection to dentin tubules is sloped for ϑ_{SIM}. ϑ_{SIM} is inverse to average tilt of dentin tubules relative to direction of the root canal.

Rezultate simulacij spektrov EPR vsake vrste smo združili in izračunali povprečne vrednosti z odstopanji (slika 13). V dentinu krokodila je bil delež preferenčno urejenih HA kristalov statistično značilno višji (34 ± 3%) kot v dentinu psa (23 ± 6%), prašiča (23 ± 5%), konja (18 ± 4%) in človeka (17 ± 2%).



Slika 13: Delež preferenčno urejenih HA kristalov (d_z). Višina stolpcev označuje povprečno vrednost, daljice pa SD. Različne črke nad daljicami označujejo statistično značilno razliko (P < 0,05).

Figure 13: Proportion of preferentially oriented hydroxyapatite crystals (d_z). Height of the columns indicates mean values, bars indicate SD. Letters above bars indicate significant difference between the species (P < 0,05).

5 RAZPRAVA

Namen študije je bil določiti lokalno urejenost ter kvantificirati delež preferenčno urejenih HA kristalov v zobeh različnih živalskih vrst in človeka. Za karseda primerljive rezultate med posameznimi osebki ter med vrstami smo uporabili vzorce dentina, izrezane iz labialne strani zgornje tretjine zobne korenine stalnih zgornjih sekalcev psov, prašičev, konjev in ljudi določenih starosti. Vsi uporabljeni zobje so bili brez znakov zobne gnilobe ali drugega obolenja mineraliziranih tkiv. Prav tako so bili klinično zdravi naključno izbrani zobje krokodila, pri katerih so bili dentinski vzroci izrezani iz enakega področja kot pri ostalih vrstah.

5.1 Naklon dentinskih kanalov glede na vertikalno os skozi središče zobne pulpe

Hribar in sod. so 2009 ugotovili, da je za uspešno izvedene simulacije spektrov EPR potrebno poznati naklon DK glede na vertikalno os skozi središče zobne pulpe. V naši raziskavi smo s SM analizirali demineralizirane, obarvane vzorce dentina in ugotovili, da DK v zgornji tretjini korenine sekalcev potekajo proti vertikalni osi skozi središče zobne pulpe v povprečju pod kotom 72 ± 13° v pasjem dentinu, 74 ± 11° v prašičjem, 65 ± 11° v konjskem, 81 ± 4° v krokodiljem in 79 ± 4° v človeškem dentinu. Huo in sod. (2000) opisujejo, da DK v vratnem delu človeškega ličnika potekajo proti vertikalni osi zoba pod kotom 45°, vendar njihovih rezultatov ni mogoče primerjati z našimi zaradi uporabe drugega tipa zob. Prav tako isti avtorji ne omenjajo, ali so uporabili ličnike iz zgornje ali spodnje čeljusti. Znano je, da se nakloni DK med zobmi v zgornji in spodnji čeljustnici statistično značilno razlikujejo (Zaslansky in sod., 2010).

Za natančneje izvedene simulacije spektrov EPR smo želeli s FM sestaviti tridimenzionalno sliko poteka DK. Ker so bili vzorci dentina optično neprosojni oz. v demineraliziranih vzorcih nismo uspeli rešiti problema difuzije molekularnih prob iz DK v PTD in ITD, smo ta korak opustili. Vzorcem dentina, katerim smo predhodno posneli spektre EPR, smo zato s FM v treh razdaljah vzdolž njihove X osi izmerili naklone DK (φ_{pulpa}, φ_{center}, φ_{cement}). Po formuli smo izračunali spremenljivost naklonov DK glede na naklon DK v srednjem delu vzorca in

ugotovili, da je bila spremenljivost pri vseh vrstah zelo majhna (do 5°). Vzorci dentina so bili torej dejansko izrezani iz področja, kjer je potek DK najbolj raven.

5.2 Usmerjenost preferenčno urejenih hidroksiapatitnih kristalov v koreninskem delu dentina ter njihova kvantifikacija

V koreninskem dentinu smo določili usmerjenost preferenčno urejenih HA kristalov ter njihov delež. Vzorce dentina smo obsevali z gama žarki Co^{60}, posledica pa je bil nastanek paramagnetnih centrov CO_2^- in CO_3^{3-} (Cevc in sod., 1980), katerih zaznavo omogoča EPR. S to metodo so v preteklosti že določili stopnjo urejenosti HA kristalov v obsevani sklenini, koreninskem cementu in kosti, saj je EPR signal kotno odvisen (Cevc in sod., 1976; Skalerič in sod., 1998; Doi in sod., 1979). Osi anizotripije magnetne sklopitve omenjenih paramagnetih centrov sta namreč usmerjeni vzporedno z daljšo oz. *c*-osjo HA kristala (Cevc in sod., 1980). Tudi v naši raziskavi na dentinu smo potrdili kotno odvisnost.

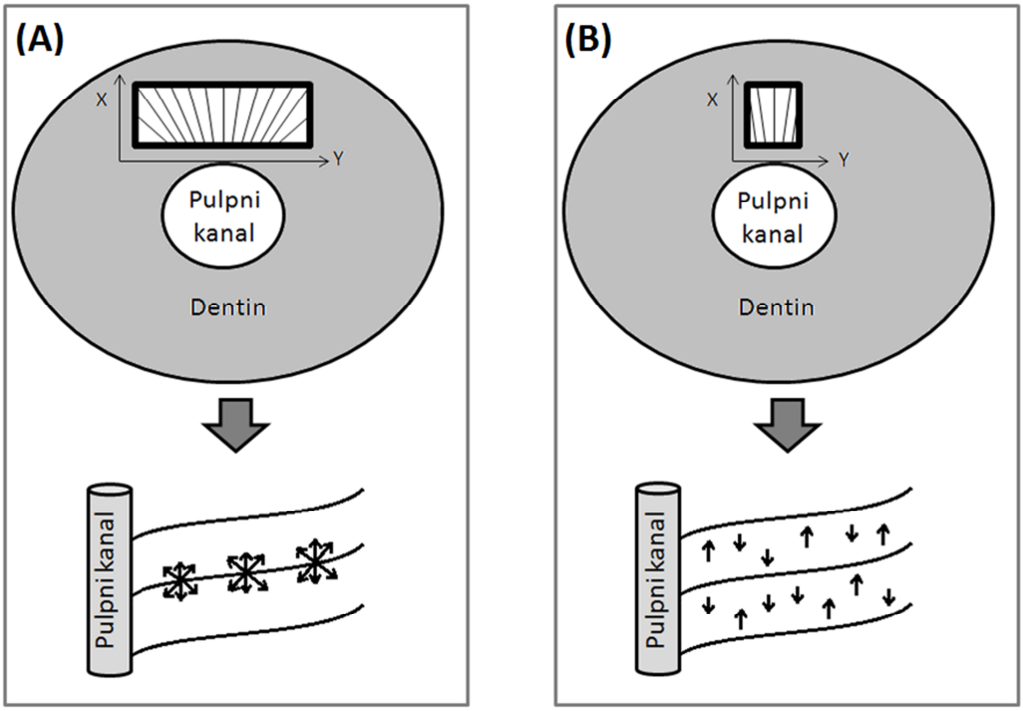
Znano je, da je kotna usmeritev mineralnih delcev v kronskem dentinu tretjih kočnikov ljudi v tesni povezavi z geometrijo zoba. Pod vrški zob so namreč *c*-osi HA kristalov usmerjene od vrškov proti pulpini votlini, torej ležijo pod določenim kotom glede na vzdolžno os zoba, medtem ko se v področju zobnega vratu njihov potek nekoliko spremeni in so s svojimi daljšimi osmi poravnani skoraj vzporedno z DSM (Märten in sod., 2010). Ta usmeritev se očitno nadaljuje tudi v koreninski dentin, saj je bilo v korenini istega tipa zob ljudi in tudi v sekalcih ter ličnikih ugotovljeno, da so *c*-osi HA kristalov urejene pretežno vzporedno s kolagenimi vlakni in torej potekajo vzporedno z vzdolžno osjo zoba (Wang in Weiner, 1998). Podobno usmeritev kristalov v dentinu opisujejo tudi v zgornjih ličnikih podgan (Stratmann in sod., 1997). Z analizo oblike spektrov EPR ter tudi z računalniškimi simulacijami spektrov smo prišli do enakih rezultatov, in sicer da so *c*-osi preferenčno urejenih HA kristalov v dentinu vratnega dela korenine sekalcev vseh preiskovanih vrst urejene cilindrično- simetrično glede na pulpin kanal oz. vzporedno z vzdolžno osjo zoba in torej pravokotno na grizno ploskev. V precej skopo bazo podatkov o ureditvi kristalov v dentinu smo tako dodali še štiri živalske vrste, med njimi tudi krokodila. Fosili, ki nedvoumno pripadajo rodu *Crocodylus*, so se

namreč pojavili že v miocenu (Brochu, 2000). Njihovi zobje so, podobno kot zobje sesalcev, sestavljeni iz sklenine, dentina in cementa (Enax in sod., 2013). Razlikujejo se v tem, da so polifiodontni. To pomeni, da se tekom življenja živali z vertikalno menjavo zamenja večje število zob (Kieser in sod., 1993).

Hribar in sod. (2009) so v svoji raziskavi z EPR v zgornji tretjini koreninskega dentina človeških sekalcev skušali potrdili oz. zavreči predvidevanja iz literature, da HA kristali v PTD ležijo pravokotno na daljšo os DK. Spektre EPR so posneli v vzorcih dentina širine 3 mm. V tako širokih vzorcih se DK pahljačasto razprostirajo v smeri ravnine XY in zato je bila občutljivost izmerjenih spektrov premajhna, da bi na podlagi spreminjanja njihove oblike glede na postavitev vzorca v magnetnem polju ali s simulacijami spektrov EPR ločili med ureditvijo preferenčno urejenih HA kristalov pravokotno na DK ali vzporedno s pulpinim kanalom (slika 14A). Porazdelitev kotov kristalov je namreč med obema ureditvama zelo podobna, v izmerjenih spektrih pa so avtorji ujeli veliko izotropnega signala, ki se z rotacijami vzorcev ni spreminjal. Na kotno neodvisen del je bil torej superponiran le majhen del preferenčno urejenih HA kristalov (5,6 ± 0,7%). V modelu so tudi privzeli, da je naklon DK v vzorcu konstanten in zato je bil vpliv orientacije kristalov še manjši. Zaključili so, da rezultati simulacij spektrov EPR podpirajo model ureditve preferenčno urejenih HA kristalov v PTD pravokotno na daljšo os DK (Hribar in sod., 2009). Poudariti pa je potrebno, da njihovi rezultati niso bili v nasprotju s simetrijo ureditve HA kristalov vzdolž pulpinega kanala, vendar se zaradi potrditve zastavljene hipoteze z njo niso ukvarjali.

V naši raziskavi smo vzorce dentina zožali na približno 0,8 mm. Potek DK smo tako omejili večinoma v smeri X osi vzorca in že z analizo oblike spektrov EPR ugotovili, da signal EPR ni odvisen od simetrije DK, temveč od simetrije pulpinega kanala. Občutljivost na razliko med obema ureditvama je namreč v redkih orientacijah HA kristalov vzdolž osi zoba, ki jih v debelem vzorcu ni mogoče zaznati (slika 14B). Da smo lahko z gotovostjo izključili vpliv poteka DK na lokalno urejenost HA kristalov, smo izvedli tudi simulacije urejenosti kristalov glede na vertikalno os skozi DK. Izmerjeni in simulirani spekter sta si bila precej različna,

medtem ko sta se izmerjeni ter simulirani spekter preferenčne urejenosti *c*-osi HA kristalov okoli vertikalne osi pulpinega kanala lepo prekrivala (slika 11).



Slika 14: Na zgornjem delu slik je shematski prikaz prečno prerezanega sekalca z označenim mestom odvzema vzorca dentina ter na spodnjem delu vzdolžni prerez sekalca s pulpinim kanalom in DK. S puščicami so prikazane ureditve HA kristalov. (A) V predhodni raziskavi (Hribar in sod., 2009) so bili vzorci dentina široki 3 mm in zato so se DK pahljačasto razprostirali proti periferiji dentina. Ker je bilo v spektrih EPR ujetega veliko izotropnega signala, so rezultati simulacij spektrov podpirali model ureditve *c*-osi preferenčno urejenih HA kristalov pravokotno na daljšo os DK. (B) V naši raziskavi smo vzorce dentina zožali na 0,8 mm in tako omejili potek DK predvsem pravokotno na Y os vzorca. Z analizo oblike spektrov EPR in s simulacijami spektrov smo ugotovili, da preferenčno urejeni HA kristali ležijo vzdolž osi pulpinega kanala.

Figure 14: Schematic presentation of a transverse section through an incisor tooth root with a rectangle indicating the dentinal sample on upper part of the pictures and longitudinal section with root canal and dentinal tubules on the lower part. Arrows indicate arrangement of HA crystals. (A) In earlier study (Hribar in sod., 2009), dentinal samples were 3 mm wide and dentinal tubules were traversing the sample at different angles relative to its Y axis. A lot of isotropic signal was captured in EPR spectra, therefore simulations supported arrangement of preferentially oriented HA crystal *c*-axes perpendicular to dentinal tubules. (B) In the current study, dentinal samples were 0,8 mm wide and dentinal tubules were traversing the sample predominantly perpendicular to its Y axis. Analyses of EPR spectra shapes disclosed arrangement of preferentially oriented HA crystals parallel to the axis of the root canal.

V literaturi ni veliko podatkov o deležu urejenih HA kristalov v dentinu. Znano je, da med različnimi stranmi zoba in različnimi tipi zob njihov delež variira tudi do 20% (Märten in sod., 2010), hkrati pa delež variira tudi skozi debelino dentina. Avtorji še danes niso enotnega mnenja, v kateri smeri se to dogaja. Eni menijo, da je ob predentinsko-dentinski meji delež urejenih kristalov višji kot ob DCM (Wang in Weiner, 1998), drugi pa, da so kristali v bližini predentina skoraj popolnoma naključno urejeni (Märten in sod., 2010).

Märten in sod. (2010) opisujejo, da stopnja urejenosti kristalov v kronskem dentinu človeka variira, in sicer od manj kot 10% pa do največ 45%. Najvišji delež so zaznali v specifičnih področjih zoba, in sicer pod vrški kron, približno 200 µm od DSM ter v vratnem delu krone. Zaključili so, da je v povprečju vsaj 80% HA kristalov dentina naključno in največ 20% preferenčno urejenih (Märten in sod., 2010). Do zelo primerljivih rezultatov smo v dentinu človeka prišli tudi v naši raziskavi. Ugotovili smo namreč, da znaša delež urejenih kristalov v osrednjem delu koreninskega dentina, tik pod vratom zoba pri človeku 17 ± 2%. V enakem področju smo pri vseh živalskih vrstah ugotovili, da je delež urejenih kristalov višji kot pri človeku, hkrati pa je vseeno obveljalo, da delež naključno razporejenih kristalov pri vseh vrstah prevladuje pred preferenčno urejenimi.

Ker metoda EPR v dentinu neselektivno zaznava paramagnetne zvrsti tako iz ITD kot tudi iz PTD, se postavlja pomembno vprašanje, kolikšen bi lahko bil doprinos HA kristalov PTD k deležu preferenčno urejenih HA kristalov. Avtorji namreč še vedno niso enotnega mnenja glede urejenosti kristalov v PTD (Schroeder in Frank, 1985; Weiner in sod., 1999; Gotliv in sod., 2006); Gotliv in sod., 2006 so celo ugotovili, da so urejeni podobno kot v ITD. V naši raziskavi smo pri različnih živalskih vrstah (razen krokodila) in človeku določili površino PTD in če k temu dodamo, da je PTD za približno 9% bolj mineraliziran kot ITD (Miller in sod., 1971; Magne in sod., 2002), ugotovimo, da je morebitni doprinos kristalov PTD v delež preferenčno urejenih kristalov nizek- pri psu le približno 2%, pri prašiču 5%, pri konju 12% ter pri človeku 6%. Menimo, da izmerjeni delež urejenih kristalov v največji meri zrcali delež urejenih kristalov ITD, ki se nahajajo v kolagenih vlaknih oz. so z njimi v tesnem stiku. Znano je, da se direktna nukleacija in rast HA kristalov odvijata v oz. na površini kolagenih vlaken in prav ti mineralni delci so poravnani vzporedno en z drugim ter sledijo vzdolžnemu poteku

vlaken (Landis in sod., 1993; Wang in Weiner, 1998), ki v ITD koreninskega dela zoba v veliki meri potekajo vzporedno z vzdolžno osjo zoba (Sögaard-Pedersen in sod., 1990; Wang in Weiner, 1998; Muylle in sod., 2000; Kinney in sod, 2001; Miguez in sod., 2004; Inoue in sod., 2011). Našo domnevo potrjujeta tudi dejstvi, da v PTD ni kolagena (Muylle in sod., 2001; Gotliv in sod., 2006; Habelitz in sod., 2007; Gotliv in Veis, 2007; Gotliv in Veis, 2009; Bertassoni in sod., 2012) in fosfoforina (Weiner in sod., 1999), ki uravnavata usmeritev rastočih HA kristalov (Mann, 1993).

Po literaturnih podatkih se direktna nukleacija HA kristalov odvija večinoma intrafibrilarno (Weiner in Wagner, 1998). Ti kristali rastejo s svojo *c*- osjo vzporedno z osjo kolagene molekule (Landis in sod., 1993) in jih je v dentinu okoli 20- 30% (Balooch in sod., 2008; Märten in sod., 2010), preostanek pa predstavljajo interfibrilarni kristali. Če torej predvidimo, da so interfibrilarni kristali naključno urejeni, lahko ugotovljeno razliko deležev urejenih kristalov med različnimi živalskimi vrstami in človekom razložimo na dva načina: 1. med vrstami variira razmerje med inter- in intrafibrilarnimi kristali ali pa 2. med vrstami variira delež kolagenih vlaken, ki potekajo vzporedno z vzdolžno osjo zoba. Na podlagi uporabljenih metod v raziskavi ali podatkov iz literature ne moremo zaključiti, katera teza bi bila dejansko vzrok za različne deleže. Zato bi veljalo nadaljnje raziskave usmerjati v določitev deleža interfibrilarnih kristalov ali določitev deleža preferenčno urejenih kolagenih vlaken v demineraliziranih vzorcih dentina.

5.3 Vpliv urejenosti hdroksiapatitnih kristalov na mehanske lastnosti dentina

Sile, ki med grizenjem delujejo na togo sklenino, se skoraj v celoti prenesejo v dentin. Mehanske lastnosti dentina primarno določajo mehanske lastnosti ITD (Kinney in sod., 1999), in sicer orientacija kolagenih vlaken (Kinney in sod., 2003b) ter vsebnost (Kinney in sod., 1996a; Angker in sod., 2004; Pugach in sod., 2009) in razporeditev mineralne snovi (Kinney in sod., 2001). Znano je, da je med obremenitvijo dentina togost oz. elastični odziv kolagenih vlaken odvisen predvsem od intrafibrilarnih kristalov (Kinney in sod., 2003a; Balooch in sod., 2008), ki so vzdolž svoje *c*-osi mehkejši in bolj prožni (Saber-Samandari in sod., 2009) ter se zlomijo pri višjih obremenitvah, kot če sile delujejo pravokotno na njihovo *c*-os (Zamiri in De, 2011). V dentinu je bilo ugotovljeno, da se njegova trdota (Kinney in sod., 1996a; Kinney in sod., 1999; Marshall in sod., 2001; Tesch in sod., 2001), trdnost in odpornost na lom (Ryuo in sod., 2011) višajo od predentinsko-dentinske meje proti DSM oz. DCM. V isti smeri se v vratnem delu kronskega dentina viša tudi delež urejenih HA kristalov (Märten in sod., 2010). Intrafibrilarni kristali torej zvišajo trdoto (Landis in sod., 1995; Kinney in sod., 2003a; Pugach in sod., 2009) in tlačno trdnost mineraliziranega tkiva (Ottani in sod., 2001; Balooch in sod., 2008; Hambli in Barkaoui, 2012), prav tako pa zvišajo tudi njegovo togost (Katti in sod., 2010; Qin in sod., 2012).

Na podlagi omenjenih ugotovitev predvidevamo, da ima glede na delež preferenčno urejenih HA kristalov, izmerjenih v naši raziskavi, dentin človeka najnižjo togost, trdoto in tlačno trdnost v primerjavi s preiskovanimi vrstami živali, hkrati pa lahko trdimo, da so iste mehanske lastnosti zaradi najvišje vsebnosti urejenih kristalov v dentinu krokodila najvišje.

Sodeč po rezultatih Kinney in sod. (2001a) ter Pugach in sod. (2009), je v dentinu človeka približno 30% intrafibrilarnih mineralov. Glede na naše rezultate in rezultate Märten in sod. (2010), je v dentinu človeka do 20% preferenčno urejenih HA kristalov. Iz tega lahko sklepamo, da v vratnem delu zoba skoraj 2/3 kolagenih vlaken v dentinu poteka v kronsko – koreninski smeri, preostali del pa je naključno razporejen. Na ta način nudi kolagen podporo ITD, saj oblikuje 3D mrežo med seboj povezanih snopov vlaken, kar še dodatno ojača strukturo dentina.

5.4 Delež urejenih hidroksiapatitnih kristalov kot možen kazalec jakosti griznih sil ter korelacija deleža z debelino sklenine

Kot smo že omenili, vpliva na mehanske lastnosti zob tudi razporeditev HA kristalov v dentinu (Kinney in sod., 2001). Prav zato je poznavanje njihove urejenosti pomembno za razumevanje prenašanja griznih sil na trda zobna tkiva, kot tudi odpornosti zob na prekomerne obremenitve.

Prašiči in ljudje so si z vidika oblike kočnikov, griznega cikla ter prehrane zelo podobni- oboji so namreč vsejedi (Weaver in sod., 1962; Herring, 1976). Kljub temu so grizne sile pri prašičih večje kot pri ljudeh (Bousdras in sod., 2006; Takahashi in sod., 2009), sklenina je približno štirikrat tanjša (Lopes in sod., 2006; Nanci in Ten Cate, 2008), vrški kron pa se vseeno deformirajo pri večjih obremenitvah (Popowics in sod. 2001). Možno je, da večja odpornost proti deformaciji prašičjega zoba izvira ravno iz višjega deleža urejenih dentinskih kristalov, saj le-ti zvečajo njegovo trdoto, trdnost in togost (Kinney in sod., 2003a; Hambli in Barkaoui, 2012). Podobno lahko trdimo tudi za psa in krokodila, saj je njuna sklenina v primerjavi s človekom prav tako tanjša (Nanci in Ten Cate, 2008; Enax in sod., 2013), maksimalne grizne sile pa so mnogo večje (Erickson in sod., 2004; Ellis in sod., 2008; Lepley in sod., 2011).

Delež urejenih HA kristalov v dentinu torej inverzno korelira z debelino sklenine. Sklenina je močno kristalizirana in zato krhka (Toit in sod., 2008), dentin pa elastičen in služi kot absorber sil, ki delujejo na zobno tkivo (Pashley, 1996). Če bi bila plast sklenine debelejša, bi pri velikih griznih silah hitreje počila. Njena naloga pri živalih z brahiodontnim tipom zob je torej najverjetneje le zaščita dentina pred obrabo ter pred vdorom mikroorganizmov skozi DK in posledičnim raztapljanjem anorganske snovi s kislinami.

Če zaenkrat dentin konja izvzamemo, ugotovimo, da rezultati deleža urejenih kristalov nekako pozitivno korelirajo z velikostjo živali oz. z velikostjo glave ter posledično z jakostjo griznih sil (Anderson in sod., 2008; Ellis in sod., 2008; Lepley in sod., 2011). Še vedno pa z višjim deležem urejenih HA kristalov pred prašičem izstopa pes. Možno je, da vzrok leži v načinu prehranjevanja, saj je pes, za razliko od prašiča in človeka, bolj ali manj mesojeda žival. Čeljustni sklep psa deluje pretežno kot tečajast sklep, ki omogoča v glavnem le

odpiranje in zapiranje gobca, latero-medialni in anterio-posteriorni gibi pa so zelo omejeni (Popowics in Herring, 2006). Naloga pasjih zob je namreč omejena na rezanje in mletje hrane do velikosti grižljaja, ki ga žival pogoltne (Vollmerhaus in sod., 1996).

Možna razlaga za nižji delež urejenih HA kristalov v dentinu konja napram dentinu psa in prašiča, ki imata manjše grizne sile (Anderson in sod., 2008; Lepley in sod., 2011), je tip zob. Sekalci psov in prašičev so brahiodontnega, medtem ko so sekalci konjev hipsodontnega tipa. To pomeni, da izraščajo skozi celo življenje živali (Budras in sod., 2003) in so se izraščanju ter načinu prehranjevanja prilagodili tako, da se zaradi razlik v trdoti gradbenih materialov zoba obrabljajo na svojstven način. Mehkejši dentin se obrabi veliko hitreje kot trša sklenina (Zheng in sod., 2003, Toit in sod., 2008) in tako ohrani ostre grizne ploskve, potrebne za grizenje rastlinske hrane. Hkrati lahko nižjemu deležu urejenih kristalov v dentinu botruje tudi drugačen način grizenja hrane. Čeljustni sklep konja je viseč in ima širšo medio-lateralno sklepno površino kot mesojedi in človek (Pence, 2002). Tak sklep mu omogoča velike latero-lateralne ter zelo omejene vertikalne premike spodnje čeljusti (Popowics in Herring, 2006) in je tako prilagojen mletju rastlinske hrane z visokim odstotkom vlaknine.

Različni deleži urejenih HA kristalov v dentinu preiskovanih vrst so lahko tudi odraz evolucijske prilagoditve zob proti zlomom. V naravi namreč poškodba oz. izguba zoba za žival pomeni nezmožnost lovljenja, hranjenja in samoobrambe. Iz literature je znano, da so urejeni HA kristali vezani v oz. neposredno na kolagena vlakna (Landis in sod., 1993; Wang in Weiner, 1998). Ker je v dentinu krokodila delež urejenih HAC precej večji kot pri drugih vrstah domnevamo, da več kolagenih vlaken sledi poteku vzdolžne osi zoba in zato so zobje krokodila bolj odporni na visoke grizne sile. Če bi bil delež urejenih kristalov pri krokodilu nižji, bi bilo vzdolž zoba urejenih manj kolagenih vlaken in bi se zob zlomil pri nižjih griznih silah. Zaradi nezmožnosti prehranjevanja taka žival ne bi preživela. Naravna selekcija preživetja vrst se torej najverjetneje odvija tudi na nivoju dentina. Pri višjih silah, ki delujejo na zob, preživijo vrste, ki imajo ustrezno višji delež urejenih HA kristalov.

5.5 Mikrostrukturiranost dentina

Pri primerjavi števila in premera DK, širine in površine PTD ter površine ITD v dentinu različnih živalskih vrst in človeka moramo izpostaviti predvsem izredno podobnost vseh parametrov med dentinom prašiča in človeka.

Gostota DK je med preiskovanimi vrstami variirala, kar opisujejo tudi drugi avtorji (Forssell-Ahlberg in sod., 1975; Schilke in sod., 2000; Robb in sod., 2007). Znano je, da je odvisna od tipa zob (Garberoglio in Brännström, 1976; Schellenberg in sod., 1992) in lokacije v zobu (Schellenberg in sod., 1992; Marshall in sod., 1997; Ferrari in sod., 2000; Chu in sod., 2010). Upada od pulpe proti zunanji površini dentina ter iz kronskega proti koreninskemu delu zoba (Marshall in sod., 1997; Chu in sod., 2010). Naši rezultati pri konju in človeku so bili primerljivi z rezultati Muylle in sod. (2002) in Chu in sod. (2010), medtem ko smo v dentinu psa ugotovili precej nižje število DK, kot je opisano v drugih raziskavah (Dutra-Correa in sod., 2007; Robb in sod., 2007). Razliko pripisujemo posledici uporabe različnih tipov zob.

Med vrstami sta variirala tudi premer DK in širina PTD. Na oba parametra zopet vpliva izbira lokacije vzorca v dentinu (Kilic in sod., 1997; Chu in sod. 2010) ter njegova priprava (Calt in Serper, 2002). V naši raziskavi dentina nismo obdelali z EDTA ali fosforno kislino, saj je znano, da povzročita demineralizacijo ITD in PTD (Van Meerbeeck in sod., 1992). Prav to je lahko vzrok za manjše premere DK v dentinu psa, konja in človeka v primerjavi z ostalimi študijami (Schilke in sod., 2000; Muylle in sod., 2002; Robb in sod., 2007). Obenem je možen vzrok tudi starost osebkov, od katerih smo pridobili vzorce. Kot je bilo že omenjeno, se s staranjem lahko lumen DK popolnoma zapolni z minerali (Micheletti, 1998). Opisano je, da je v vratnem delu koreninskega dentina človeških kočnikov širina PTD 0,2 µm (Chu in sod., 2010). V enakem področju človeških sekalcev smo izmerili širino PTD 0,7 µm. Ker je bila priprava vzorcev v obeh primerih podobna, lahko razliko vsaj delno pojasnimo z uporabo različnih tipov zob. Širina PTD namreč narašča od predentinsko-dentinske meje proti DSM oz. DCM (Forssell-Ahlberg in sod., 1975; Muylle in sod., 2002), vendar njegovo širjenje skozi debelino dentina ni linearno (Chu in sod., 2010). Možno je, da med različnimi tipi zob skozi debelino dentina variira tudi širina PTD.

PTD predstavlja le majhen odstotek vsega dentina (Goldberg in Lasfargues, 1995). To ugotovitev smo potrdili, saj je znašal delež PTD pri psu, prašiču in človeku približno 1/20, pri konju pa približno 1/8 celotnega dentina. Delež PTD smo pri omenjenih vrstah primerjali z deležem urejenih HA kristalov in ugotovili, da med njima ni povezave. Tako smo se še dodatno prepričali, da delež urejenih kristalov v največji meri izvira iz ITD in ne iz PTD.

Pri psu, prašiču, konju in človeku je ITD predstavljal glavno maso dentina. Delež ITD je bil podoben le med prašičem in človekom. Največji delež ITD smo opazili v dentinu psa, najmanjšega pa v dentinu konja. To je v nasprotju z rezultati Robb in sod. (2007), kjer je bil delež ITD v dentinu človeka višji kot pri psu. Različne rezultate med raziskavama lahko zopet razložimo z uporabo različnih tipov zob- grabilci oz. podočniki pri Robb in sod. (2007) ter sekalci v naši. Ker smo v raziskavi vzorce pri vseh vrstah izrezali iz enakega področja dentina, lahko razlike mikrostukturnih parametrov resnično pripišemo medvrstni variabilnosti.

Na posnetkih vrstičnega elektronskega mikroskopa se je mikrostruktura dentina krokodila najbolj razlikovala od ostalih vrst (slika 7). Gostota DK je bila signifikantno večja in torej je signifikantno večje tudi število odontoblastov. Predvidevamo, da več odontoblastov hitreje sintetizira več kolagenih vlaken, zaradi večje gostote DK je razdalja med njimi manjša, difuzija ionov kalcija in fosforja na kvadrat razdalje pa posledično hitrejša. Tako je omogočen hitrejši nastanek dentina, saj se pri krokodilu z vertikalno menjavo vsi zobje v ustni votlini zamenjajo v povprečju na 12 mesecev (Edmund, 1960), menjava zob pa poteka skozi njegovo celo življenje (Kieser in sod., 1993).

Krokodil se tekom evolucije ni spreminjal veliko. Da je lahko preživel z visokimi griznimi silami, ki jih uporablja, se je moral njegov dentin oz. zob temu prilagoditi. Razvoj zoba je pri krokodilu zelo hiter, v funkciji pa je le približno 12 mesecev (Edmund, 1960). Zato najverjetneje ni časa, da bi se PTD oblikoval v taki meri kot pri ostalih vrstah. Na posnetkih vrstičnega elektronskega mikroskopa dentina krokodila okoli DK namreč ni bilo dobro definiranega obroča PTD. Na podlagi rezultatov EPR ima krokodil večji delež urejenih HA kristalov kot druge vrste, ki ni povezan s PTD (urejeni HAC se nahajajo v kolagenih vlaknih in v njihovi neposredni bližini (Landis in sod., 1993; Wang in Weiner, 1998), v PTD pa ni

kolagena (Muylle in sod., 2001; Gotliv in sod., 2006; Habelitz in sod., 2007; Gotliv in Veis, 2007; Gotliv in Veis, 2009; Bertassoni in sod., 2012)) in torej posnetek vrstičnega elektronskega mikroskopa pri krokodilu zmanjšuje pomen PTD.

6 ZAKLJUČKI

1. Dentinski kanali v vratnem delu koreninskega dentina vseh preiskovanih vrst potekajo proti vertikalni osi skozi središče zobne pulpe pod ostrim kotom, njihov naklon pa se spreminja minimalno. Vzorci dentina so bili torej resnično izrezani iz osrednjega dela dentina, kjer je potek dentinskih kanalov najbolj raven.

2. Mikrostrukturiranost dentina psa, prašiča, konja in človeka je bila primerljiva. Najbolj sta si bila podobna dentin prašiča in človeka.

3. *C*-osi preferenčno urejenih HA kristalov so v vratnem delu koreninskega dentina preiskovanih vrst urejene cilindrično- simetrično glede na pulpino votlino oz. vzporedno z vzdolžno osjo zoba in torej pravokotno na grizno ploskev. Ker so HA kristali vzdolž *c*- osi mehkejši in bolj prožni, večji delež tako urejenih kristalov izboljša mehanske lastnosti dentina.

4. Velik del HA kristalov v koreninskem dentinu preiskovanih vrst je naključno razporejen, sorazmerno majhen del pa urejen. Največji delež preferenčno urejenih HA kristalov smo ugotovili v dentinu krokodila, sledil mu je dentin psa, prašiča in konja. Najmanjši delež preferenčno urejenih HA kristalov smo ugotovili v dentinu človeka. Ker se v podobnem vrstnem redu med vrstami nižajo tudi grizne sile, ki delujejo na zobno substanco med grizenjem, bi lahko delež urejenih HA kristalov v dentinu odražal jakost griznih sil.

7 POVZETEK

Dentin tvori osnovo zoba in mu daje obliko. Skozi debelino je perforiran s številnimi dentinskimi kanali (DK). Njihova pot se začne v predentinu in se vzpenja pod določenim kotom do dentinsko-skleninske oz. dentinsko-cementne meje. Obdaja jih plast hipermineraliziranega peritubularnega dentina (PTD), katerega debelina narašča proti periferiji dentina. Največjo maso v dentinu predstavlja intertubularni dentin (ITD). Velik del kolagenih vlaken v ITD poteka vzporedno z vzdolžno osjo zoba oz. pravokotno na DK. Hidroksiapatitni (HA) kristali so glavni gradniki anorganskega dela dentina. Nahajajo se interfibrilarno in intrafibrilarno.

V raziskavi smo proučevali mikrostrukturiranost dentina psov, prašičev, konjev, krokodila in ljudi določenih starosti. Želeli smo določiti lokalno urejenost HA kristalov ter delež urejenih kristalov v dentinu omenjenih vrst. Dentinski vzorci so izhajali iz labialne strani vratnega dela korenine zdravih sekalcev in naključno izbranih zob pri krokodilu. S svetlobno mikroskopijo smo določili naklone DK proti vertikalni osi skozi središče zobne pulpe na demineraliziranih zobeh. Le v dentinu krokodila (81 ± 4°) in človeka (79 ± 4°) je bil naklon DK statistično značilno višji kot v dentinu konja (65 ± 11°). Nakloni DK v vzorcih dentina vseh vrst se z razdaljo od pulpinega kanala niso spreminjali veliko.

Med vrstami smo primerjali število in premer DK, širino in površino PTD ter površino ITD, preiskovane z vrstično elektronsko mikroskopijo. V dentinu krokodila je bilo število DK statistično značilno višje kot pri ostalih vrstah, v dentinu psa pa sta bili širina in površina PTD statistično značilno nižji in površina ITD statistično značilno višja kot pri ostalih vrstah. Mikrostrukturno sta si bila najbolj podobna dentin prašiča in človeka, saj pri nobenem parametru med njima ni bilo statistično značilnih razlik.

Dokazali smo kotno odvisnost signala EPR v dentinu. *C*-osi urejenih HA kristalov so pri vseh vrstah potekale vzporedno z vzdolžno osjo zoba. S simulacijami spektrov EPR smo določili delež urejenih kristalov, ki je bil najvišji v dentinu krokodila in se je nižal od psa, prašiča, konja pa do človeka. Ugotovili smo, da je v dentinu vseh preiskovanih vrst večji del HA kristalov naključno urejen in le majhen del urejen v kronsko- koreninski smeri.

Menimo, da urejeni HA kristali izvirajo iz ITD in ležijo med kolagenimi vlakni oz. so z njimi v tesnem stiku. Ti, t.i. intrafibrilarni kristali, zvišajo trdoto, tlačno trdnost in togost mineraliziranega tkiva, zato so najverjetneje mehanske lastnosti v dentinu človeka najnižje, najvišje pa so v dentinu krokodila. Ker deleži urejenih kristalov pretežno pozitivno korelirajo z griznimi silami, bi lahko bili tudi odraz evolucijske prilagoditve zob na potencialne obremenitve.

8 SUMMARY

Dentin forms the bulk of a tooth and gives it its shape. Throughout its thickness, dentin is perforated by multiple dentinal tubules (DK). Dentinal tubules ascend from predentin towards dentino- enamel or dentino- cemental junction. They are surrounded by a hypermineralized collar of peritubular dentin (PTD), whose thickness increases towards the periphery of the dentin. Intertubular dentin (ITD) represents the major part of dentin. Collagen fibrils in ITD are preferentially oriented parallely to the vertical axis of the tooth and perpendicularly to DK. Hydroxyapatite (HA) crystals are the main building blocks of inorganic part of the dentin. They are located interfibrilary and intrafibrilary.

In the present study, microstructure of canine, porcine, equine, crocodile and human dentin of a particular age was investigated. Our aim was to determine the local arrangement of HA crystals and the proportion of oriented crystals. Dentinal samples were obtained from the cervical part of the tooth root from healthy incisor teeth and randomly collected crocodile teeth. The tilt angles of DK relative to vertical axis of dental pulp were determined on demineralized samples by light microscopy. Angles of DK in crocodile dentin (81 ± 4°) and human (79 ± 4°) were significantly larger than angles of DK in equine dentin (65 ± 11°). Variations in tilt angles of DK with the distance from the root canal were extremely small.

Density and diameter of DK, thickness and surface area of PTD and surface area of ITD, obtained by scanning electron microscopy, were comparable between species. In crocodile dentin, the largest mean DK density was observed, while the thickness and surface area of PTD were significantly lower in canine dentin and, consequently, canine ITD surface area was significantly larger than in other species. Porcine dentin shared most microstructural similarities to human dentin with no significant differences found in all investigated parameters.

Angular dependence of EPR spectra in dentin was demonstrated. *C*-axes of HA crystals in all investigated species were arranged parallely to the vertical axis of the tooth. Simulations of EPR spectra demonstrated proportions of oriented crystals. In crocodile dentin, the portion of oriented crystals was the largest and it declined from canine, porcine, equine to human

dentin. The proportion of the non-oriented HA crystals in all investigated species was higher in comparison to oriented HA crystals.

We suggest that oriented HA crystals originate from ITD and are positioned between the collagen fibrils or are in close association with them. Intrafibrilar HA crystals increase hardness, compressive strength and stiffness of mineralized tissue and therefore it is likely that these mechanical properties in human dentin are the lowest and in crocodile dentin are the largest. Proportions of oriented HA crystals in investigated species fairly positively correlate to bite forces, hence these proportions could reflect evolutionary adaptations of teeth to specific or potentional mechanical forces that might cause tooth fractures.

9 ZAHVALA

Spoštovanemu mentorju, *prof. dr. Zlatku Pavlici*. Najlepša hvala za strokovno vodstvo, podporo in zaupanje v obdobju raziskovanja.
Spoštovanemu somentorju, *prof. dr. Milanu Petelinu*. Iskrena hvala za zaupanje raziskovanja v interdisciplinarnem projektu, za strokovno podporo in vzpodbudo.

Cenjenim članom ocenjevalne komisije: predsedniku prof. dr. Gregorju Fazarincu ter *prof. dr. Janezu Štrancarju*, *doc. dr. Zoranu Arsovu* in *doc. dr. Roku Gašperšiču*. Najlepša hvala za kritiko našega dela in koristne napotke, ki so doktorsko disertacijo še izboljšali.

Hvala *Ministrstvu za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo*, ki mi je v okviru javnega razpisa »Inovativna shema za sofinanciranje doktorskega študija za spodbujanje sodelovanja z gospodarstvom in reševanja aktualnih družbenih izzivov – generacija 2010 Univerza v Ljubljani« sofinanciralo doktorski študij.

Dr. Iztok Urbančič. Hvala za vse razlage in pomoč pri obvladovanju spektrometra EPR.
Dr. Daniele Biglino. Thank you for letting me know that EPR is not such a big deal...
Ostalo osebje IJS Odseka za fiziko trdne snovi, delo z vami je bilo vedno zanimivo.

Doc. dr. Alenka Pavlič. Najlepša hvala za uvod v vrstično elektronsko mikroskopijo in vse napotke, ki so naš članek spravili na svet.
Prof. dr. Petra Zrimšek. Hvala za statistično analizo in za pomoč pri interpretaciji rezultatov.
Doc. dr. Aleš Nagode. Delo na vrstičnem elektronskem mikroskopu s teboj ni bilo nikoli dolgočasno. In hvala za vse razlage o mehanskih lastnostih snovi.

Hvala *Niki Breskvar* za tehnično pomoč na vrstičnem elektronskem mikroskopu ter *Jasni Šporar* za tehnično pomoč pri pripravi histoloških rezin zob.
Dr. Gerhard Steenkamp. Although you didn't know me you selflessly obtained crocodile teeth and all the necessary export permits. Thank you!
Za lektoriranje doktorskega dela se iskreno zahvaljujem *Martinu Kovšetu*.
Hvala tudi *doc. dr. Ani Nemec*. Za angleško lektoriranje in nešteto pridobljenih člankov.
Mag. Brigiti Grecs-Smole se zahvaljujem za natančen pregled citirane literature.

Mami, *oči* in *Jure*. Srčno hvala, ker verjamete vame in me brezmejno podpirate pri uresničevanju mojih sanj! Brez vas mi ne bi uspelo.

Miha, *Mojca* in *Frenk*. Hvala za pogovore o smiselnosti in trdno podporo, še posebej v času, ko sem jo najbolj potrebovala... Ker ne obupate nad mano.

Barbara Celinšek, zimrica. Iskrena hvala za večni optimizem, vzpodbudne besede, ko mi je bilo najtežje in za prečudovita 4 leta v »bizarni«. Nikoli nama ni bilo dolgčas...

Hvala dragim prijateljicam *Urši*, *Anji* in *Eleni*, *Cvetki*. Ker ste verjele vame in mi stale ob strani.

Bivšim *sodelavcem s KKMŽ*. Za razkritje vseh skrivnosti veterinarske medicine psov in mačk.

Hvala tudi *vsem*, ki ste mi pomagali pri delu, pa vas nisem omenila.

10 LITERATURA

Ambica K, Mahendran K, Talwar S, Verma M, Padmini G, Periasamy R. Comparative evaluation of fracture resistance under static and fatigue loading of endodontically treated teeth restored with carbon fiber posts, glass fiber posts, and an experimental dentin post system: an in vitro study. J Endod 2013; 39(1): 96–100.

Anderson RA, McBrayer LD, Herrel A. Bite force in vertebrates: opportunities and caveats for use of a nonpareil whole-animal performance measure. Biol J Linnean Soc 2008; 93: 709–20.

Angker L, Nockolds C, Swain MV, Kilpatrick N. Correlating the mechanical properties to the mineral content of carious dentine- a comparative study using an ultra-micro indentation system (UMIS) and SEM-BSE signals. Arch Oral Biol 2004; 49(5): 369–78.

Atkins T. Teeth as cutting tools. In: The science and engineering of cutting: the mechanics and processes of separating and puncturing biomaterials, metals and non-metals. Amsterdam: Elsevier, 2009: 307–25.

Balooch M, Habelitz S, Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. Mechanical properties of mineralized collagen fibrils as influenced by demineralization.
J Struct Biol 2008; 162(3): 404–10.

Bar-On B, Wagner HD. Enamel and dentin as multi-scale bio-composites.
J Mech Behav Biomed Mater 2012; 12: 174–83.

Bechtle S, Fett T, Rizzi G, Habelitz S, Klocke A, Schneider GA. Crack arrest within teeth at the dentinoenamel junction caused by elastic modulus mismatch.
Biomaterials 2010; 31(14): 4238–47.

Bertassoni LE, Stankoska K, Swain MV. Insights into the structure and composition of the peritubular dentin organic matrix and the lamina limitans. Micron 2012; 43(2/3): 229–36.

Bodier-Houllé P, Steuer P, Voegel JC, Cuisinier FJ. First experimental evidence for human dentine crystal formation involving conversion of octacalcium phosphate to hydroxyapatite. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 1998; 54(Pt 6 Pt 2): 1377–81.

Bonucci E. Biological calcification: normal and pathological processes in the early stages. Berlin; Heidelberg: Springer, 2007: 67–103.

Bonucci E. Matrix vesicles, their role in calcification. In: Linde A, eds. Dentin and dentinogenesis. Vol. 1. Boca Raton: CRC Press, 1984: 135–54.

Boskey AL. The role of extracellular matrix components in dentin mineralization.
Crit Rev Oral Biol Med 1991; 2: 369–87.

Botha J, Lee-Thorp J, Sponheimer M. An examination of triassic cynodont tooth enamel chemistry using fourier transform infrared spectroscopy. Calcif Tissue Int 2004; 74(2): 162–9.

Bousdras VA, Cunningham JL, Ferguson-Pell M, et al. A novel approach to bite force measurements in a porcine model *in vivo*. Int J Oral Maxillofac Surg 2006; 35(7): 663–7.

Boyde A, Lester KS. An electron microscope study of fractured dentinal surfaces.
Calcif Tissue Res 1967; 1(2): 122–36.

Breschi L, Gobbi P, Mazzotti G, Ellis TH, Sacher E, Stangel I. Field emission in-lens SEM study of enamel and dentin. J Biomed Mater Res 1999; 46(3)315–23.

Brik A, Radchuk V, Scherbina O, Matyash M, Gaver O. Metamorphic modifications and EPR dosimetry in tooth enamel. Appl Radiat Isot 1996; 47(11-12): 1317–9.

Brochu CA. Phylogenetic relationships and divergence timing of crocodylus based on morphology and the fossil record. Copeia 2000; 2000(3): 657–73.

Budras KD, Sack WO, Roeck S, Wuensche A, Henschel E. Anatomy of the horse: an illustrated text. Hannover: Schluetersche, 2003.

Butler WT. Dentin matrix proteins and dentinogenesis.
Connect Tissue Res 1995; 33(1/3): 59–65.

Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. Int J Dev Biol 1995; 39: 169–79.

Calt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures.
J Endod 2002; 28(1): 17–9.

Cevc G, Cevc P, Schara M, Skalerič U. The caries resistance of human teeth is determined by the spatial arrangement of hydroxyapatite microcrystals in enamel.
Nature 1980; 286: 425–6.

Cevc P, Schara M, Ravnik C, Skaleric U. Study of the arrangement of crystallites in gamma-irradiated human enamel by electron paramagnetic resonance.
J Dent Res 1976; 55(4): 691–5.

Coradazzi JL, Silva CM, Pereira JC, Francischone CE. Shear bond strength of an adhesive system in human, bovine and swinish teeth. Rev Fac Odontol Bauru 1998; 6(4): 29–33.

Costa LR, Watanabe IS, Kronka MC, Silva MC. Structure and microstructure of coronary dentin in non-erupted human deciduous incisor teeth. Braz Dent J 2002; 13(3): 170–4.

Cox CF, White KC, Ramus DL, Farmer JB, Snuggs HM. Reparative dentin: factors affecting its deposition. Quintessence Int 1992; 23(4): 257–70.

Chu CY, Kuo TC, Chang SF, Shyu YC, Lin CP. Comparison of the microstructure of crown and root dentin by a scanning electron microscopic study. J Dent Sci 2010; 5(1): 14–20.

Cuisinier FJG, Steuer P, Brisson A, Voegel JC. High resolution electron microscopy study of crystal growth mechanisms in chicken bone composites.
J Cryst Growth 1995; 156(4): 443–53.

Dahl T, Sabsay B, Veis A. Type I collagen-phosphophoryn interactions: specificity of the monomer-monomer binding. J Struct Biol 1998; 123: 162–8.

Dai XF, Ten Cate AR, Limeback H. The extent and distribution of intratubular collagen fibrils in human dentine. Arch Oral Biol 1991; 36(10): 775–8.

Dauphin Y, Massard P, Quantin C, Montuelle S. Experimental *in vitro* dissolution of the dentine of teeth of Sus scrofa (Mammalia, Suidae): chemistry and microstructural alterations. Archaeometry 2013; 55(1): 134–47.

Dauphin Y, Williams CT. Chemical composition of enamel and dentine in modern reptile teeth. Mineral Mag 2008; 72(1): 247–50.

Dixon PM. Dental Anatomy. In: Baker GJ, Easley J, eds. Equine dentistry. 2nd ed.
Edinburgh: Elsevier Saunders, 2005: 25–48.

Doi Y, Aoba T, Okazaki M, Takahashi J, Moriwaki Y. Analysis of paramagnetic centers in x-ray-irradiated enamel, bone and carbonate-containing hydroxyapatite by electron spin resonance spectroscopy. Calcif Tissue Int 1979; 28: 107–12.

Dubey DK, Tomar V. Role of the nanoscale interfacial arrangement in mechanical strength of tropocollagen-hydroxyapatite-based hard biomaterials. Acta Biomater 2009; 5(7): 2704–16.

Dutra-Correa M, Anauate-Netto C, Arana-Chavez VE. Density and diameter of dentinal tubules in etched and non-etched bovine dentin examined by scanning electron microscopy. Arch Oral Biol 2007; 52: 850–5.

Edmund GA. Class Reptilia, subclass Archosauria, order Crocodilia. In: Edmund GA. Tooth replacement phenomena in the lower vertebrates.
Toronto: Life Sciences Division, Royal Ontario Museum, 1960: 113–20.

Ehrlich H, Hanke T, Simon P, et al. Carboxymethylation of the fibrillar collagen with respect to formation of hydroxyapatite. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2010; 92(2): 542–51.

Elbaum R, Tal E, Perets AI, et al. Dentin micro-architecture using harmonic generation microscopy. J Dent 2007; 35(2): 150–5.

Elliott JC, Wilson RM, Dowker SEP. Apatite structures. Adv X Ray Anal 2002; 45: 172–81.

Ellis JL, Thomason JJ, Kebreab E, France J. Calibration of estimated biting forces in domestic canids: comparison of post–mortem and in vivo measurements. J Anat 2008; 212(6): 769–80.

Enax J, Fabritius HO, Rack A, Prymak O, Raabe D, Epple M. Characterization of crocodile teeth: correlation of composition, microstructure, and hardness.
J Struct Biol 2013; 184(2): 155–63.

Erickson GM, Gignac PM, Steppan SJ, et al. Insights into the ecology and evolutionary success of crocodilians revealed through bite-force and tooth-pressure experimentation.
PLoS One 2012; 7(3): e31781. (12 str.)
http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0031781 (14. april 2014)

Ferrari M, Mannocci F, Vichi A, Cagidiaco MC, Mjör IA. Bonding to root canal: structural characteristics of the substrate. Am J Dent 2000; 13(5): 255–60.

Forssell-Ahlberg K, Brännström M, Edwall L. The diameter and number of dentinal tubules in rat, cat, dog and monkey. A comparative scanning electron microscopic study.
Acta Odontol Scand 1975; 33(5): 243–50.

Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. Arch Oral Biol 1976; 21(6): 355–62.

Glimcher MJ. A basic architectural principle in the organization of mineralized tissues.
Clin Orthop Relat Res 1968; 61: 16–36.

Goldberg M, Lasfargues JJ. Pulpo-dentinal complex revisited. J Dent 1995; 23(1): 15–20.

Goldberg M, Septier D, Lécolle S, et al. Dental mineralization.
Int J Dev Biol 1995; 39(1): 93–110.

Gotliv BA, Robach JS, Veis A. The composition and structure of bovine peritubular dentin: mapping by time of flight secondary ion mass spectroscopy.
J Struct Biol 2006; 156(2): 320–33.

Gotliv BA, Veis A. Peritubular dentin, a vertebrate apatitic mineralized tissue without collagen: role of a phospholipid-proteolipid complex. Calcif Tissue Int 2007; 81(3): 191–205.

Gotliv BA, Veis A. The composition of bovine peritubular dentin: matching TOF-SIMS, scanning electron microscopy and biochemical component distributions. New light on peritubular dentin function. Cells Tissues Organs 2009; 189(1/4): 12–9.

Habelitz S, Rodriguez BJ, Marshall SJ, Marshall GW, Kalinin SV, Gruverman A. Peritubular dentin lacks piezoelectricity. J Dent Res 2007; 86(9): 908–11.

Hambli R, Barkaoui A. Physically based 3D finite element model of a single mineralized collagen microfibril. J Theor Biol 2012; 301: 28–41.

Hellmich Ch, Ulm FJ. Are mineralized tissues open crystal foams reinforced by crosslinked collagen? Some energy arguments. J Biomech 2002; 35(9): 1199–212.

Hennig GJ, Herr W, Weber E, Xirotiris NI. ESR-dating of the fossil hominid cranium from Petralona cave, Greece. Nature 1981; 292: 533–6.

Herr P, Holz J, Baume LJ. Mantle dentine in man--a quantitative microradiographic study. J Biol Buccale 1986; 14(2): 139–46.

Herring SW. The dynamics of mastication in pigs. Arch Oral Biol 1976; 21(8): 473–80.

Heywood BR, Sparks NH, Shellis RP, Weiner S, Mann S. Ultrastructure, morphology and crystal growth of biogenic and synthetic apatites. Connect Tissue Res 1990; 25(2): 103–19.

Houllé P, Voegel JC, Schultz P, Steuer P, Cuisinier FJG. High resolution electron microscopy: structure and growth mechanisms of human dentin crystals. J Dent Res 1997; 76: 895–904.

Hong H, Tie L, Jian T. The crystal characteristics of enamel and dentin by XRD method. J Wuhan Univ Technol Mater Sci Ed 2006; 21(1): 9–12.

Hribar S, Rauter A, Štrancar J, Pavlica Z, Petelin M. Ureditev hidroksiapatitnih kristalov v dentinu. Zobozdrav Vestn 2009; 64: 3–8.

Huo B, Zheng QS, Zhang Q, Wang J. Effect of dentin tubules to the mechanical properties of dentin. Part II: Experimental study. Acta Mech Sin 2000; 16(1): 75–82.

Ibrahim DM, Mostafa AA, Korowash SI. Chemical characterization of some substituted hydroxyapatites. Chem Cent J 2011; 5(1): e74 (11 str.).
http://journal.chemistrycentral.com/content/pdf/1752-153X-5-74.pdf (14. april 2014)

Ibrahim NM, Parekh S, Brett P, Bozec L. A study of the physical properties of dentinogenesis imperfecta. In: 91st General session of the International Association For Dental Research (IADR). Seattle, 2013: 3358.
http://www.ucl.ac.uk/eastman/research/information/posters/51 (14. april 2014)

Inoue T, Nishimura F, Debari K, Kou K, Miyazaki T. Fatigue and tensile properties of radicular dentin substrate. J Biomech 2011; 44(4): 586–92.

Iwamoto N, Ruse ND. Fracture toughness of human dentin. J Biomed Mater Res A 2003; 66(3): 507–12.

Jantarat J, Palamara JE, Lindner C, Messer HH. Time-dependent properties of human root dentin. Dent Mater 2002; 18(6): 486–93.

Jean A, Kerebel B, Kerebel LM. Scanning electron microscope study of the predentin-pulpal border zone in human dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1986; 61(4): 392–8.

Ji B, Gao H. Mechanical properties of nanostructure of biological materials.
J Mech Phys Solids 2004; 52: 1963–90.

Johansen E, Parks HF. Electron-microscopic observations on sound human dentine.
Arch Oral Biol 1962; 7: 185–93.

Katti DR, Pradhan SM, Katti KS. Directional dependence of hydroxyapatite-collagen interactions on mechanics of collagen. J Biomech 2010; 43(9): 1723–30.

Kierdorf H, Kierdorf U. A scanning electron microscopic study on the distribution of peritubular dentine in cheek teeth of Cervidae and Suidae (Mammalia, Artiodactyla).
Anat Embryol 1992; 186(4): 319–26.

Kieser JA, Klapsidis C, Law L, Marion M. Heterodonty and patterns of tooth replacement in *Crocodylus niloticus*. J Morphol 1993; 218(2): 195–201.

Kilic S, Dixon P, Kempson S. A light microscopic and ultrastructural examintaion of calcified dental tissues of horses: 3. dentin. Equine Vet J 1997; 29: 206–12.

Kinney JH, Balooch M, Marshall GW, Marshall SJ. A micromechanics model of the elastic properties of human dentine. Arch Oral Biol 1999; 44(10): 813–22.

Kinney JH, Balooch M, Marshall SJ, Marshall GW Jr, Weihs TP. Atomic force microscope measurements of the hardness and elasticity of peritubular and intertubular human dentin.
J Biomech Eng 1996b; 118(1): 133–5.

Kinney JH, Balooch M, Marshall SJ, Marshall GW Jr, Weihs TP. Hardness and Young's modulus of human peritubular and intertubular dentine. Arch Oral Biol 1996a; 41(1): 9–13.

Kinney JH, Gladden JR, Marshall GW, Marshall SJ, So JH, Maynard JD. Resonant ultrasound spectroscopy measurements of the elastic constants of human dentin.
J Biomech 2004; 37(4): 437–41.

Kinney JH, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. The importance of intrafibrillar mineralization of collagen on the mechanical properties of dentin.
J Dent Res 2003a; 82(12): 957–61.

Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. The mechanical properties of human dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature. Crit Rev Oral Biol Med 2003b; 14(1): 13–29.

Kinney JH, Nalla RK, Pople JA, Breunig TM, Ritchie RO. Age-related transparent root dentin: mineral concentration, crystallite size, and mechanical properties.
Biomaterials 2005; 26(16): 3363–76.

Kinney JH, Pople JA, Marshall GW, Marshall SJ. Collagen orientation and crystallite size in human dentin: a small angle X-ray scattering study. Calcif Tissue Int 2001; 69(1): 31–7.

Kodaka T, Debari K, Yamada M. Physico-chemical and morphological studies of horse dentin. J Electron Microsc 1991; 40(6): 385–91.

Komabayashi T, Nonomura G, Watanabe LG, Marshall GW Jr, Marshall SJ. Dentin tubule numerical density variations below the CEJ. J Dent 2008; 36(11): 953–8.

Krifka S, Börzsönyi A, Koch A, Hiller KA, Schmalz G, Friedl KH. Bond strength of adhesive systems to dentin and enamel-human vs. bovine primary teeth in vitro.
Dent Mater 2008; 24(7): 888–94.

Landis WJ. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix.
Bone 1995; 16(5): 533–44.

Landis WJ, Hodgens KJ, Arena J, Song MJ, McEwen BF. Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography. Microsc Res Tech 1996; 33(2): 192–202.

Landis WJ, Librizzi JJ, Dunn MG, Silver FH. A study of the relationship between mineral content and mechanical properties of turkey gastrocnemius tendon.
J Bone Miner Res 1995; 10(6): 859–67.

Landis WJ, Song MJ, Leith A, McEwen L, McEwen BF. Mineral and organic matrix interaction in normally calcifying tendon visualized in three dimensions by high-voltage electron microscopic tomography and graphic image reconstruction. J Struct Biol 1993; 110(1): 39–54.

LeGeros RZ, Tung MS. Chemical stability of carbonate- and fluoride-containing apatites. Caries Res 1983; 17(5): 419–29.

Lepley CR, Throckmorton GS, Ceen RF, Buschang PH. Relative contributions of occlusion, maximum bite force, and chewing cycle kinematics to masticatory performance.
Am J Orthod Dentofacial Orthop 2011; 139(5): 606–13.

Leventouri T. Synthetic and biological hydroxyapatites: crystal structure questions. Biomaterials 2006; 27(18): 3339–42.

Leventouri T, Antonakos A, Kyriacou A, Venturelli R, Liarokapis E, Perdikatsis V. Crystal structure studies of human dental apatite as a function of age.
Int J Biomater 2009; 2009: e698547 (6 str.).
http://www.hindawi.com/journals/ijbm/2009/698547/ (14. april 2014)

Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. Crit Rev Oral Biol Med 1993; 4(5): 679–728.

Linde A, Lundgren T. From serum to the mineral phase. The role of the odontoblast in calcium transport and mineral formation. Int J Dev Biol 1995; 39(1): 213–22.

Lloyd GE. Atomic number and crystallographic contrast images with the SEM: a review of backscattered electron techniques. Mineral Mag 1987; 51: 3–19.

Lopes FM, Markarian RA, Sendyk CL, Duarte CP, Arana-Chavez VE. Swine teeth as potential substitutes for in vitro studies in tooth adhesion: a SEM observation.
Arch Oral Biol 2006; 51(7): 548–51.

Lopes MB, Sinhoreti MA, Gonini Júnior A, Consani S, McCabe JF. Comparative study of tubular diameter and quantity for human and bovine dentin at different depths.
Braz Dent J 2009; 20(4): 279–83.

Lu Y, Xie Y, Zhang S, Dusevich V, Bonewald LF, Feng JQ. DMP1-targeted Cre expression in odontoblasts and osteocytes. J Dent Res 2007; 86(4): 320–5.

Magne D, Guicheux J, Weiss P, Pilet P, Daculsi G. Fourier transform infrared microspectroscopic investigation of the organic and mineral constituents of peritubular dentin: a horse study. Calcif Tissue Int 2002; 71(2): 179–85.

Mann S. Molecular tectonics in biomineralization and biomimetic materials chemistry. Nature 1993; 365: 499–505.

Marshall GW, Habelitz S, Gallagher R, Balooch M, Balooch G, Marshall SJ. Nanomechanical properties of hydrated carious human dentin. J Dent Res 2001; 80(8): 1768–71.

Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. J Dent 1997; 25(6): 441–58.

Märten A, Fratzl P, Paris O, Zaslansky P. On the mineral in collagen of human crown dentine. Biomaterials 2010; 31(20): 5479–90.

Micheletti CM. Dental histology: study of aging processes in root dentine.
Boll Soc Ital Biol Sper 1998; 74(3/4): 19–28.

Miguez PA, Pereira PN, Atsawasuwan P, Yamauchi M. Collagen cross-linking and ultimate tensile strength in dentin. J Dent Res 2004; 83(10): 807–10.

Miller WA, Eick JD, Neiders ME. Inorganic components of the peritubular dentin in young human permanent teeth. Caries Res 1971; 5(3): 264–78.

Mjör IA Nordahl I. The density and branching of dentinal tubules in human teeth. Arch Oral Biol 1996; 41(5): 401–12.

Mjör IA, Pindborg JJ. Histology of the human tooth. Copenhagen: Munksgaard, 1973: 23–38.

Muylle S, Simoens P, Lauwers H. A study of the ultrastructure and staining characteristics of the »dental star« of equine incisors. Equine Vet J 2002; 34(3): 230–4.

Muylle S, Simoens P, Lauwers H. The distribution of intratubular dentine in equine incisors: a scanning electron microscopic study. Equine Vet J 2001; 33(1): 65–9.

Muylle S, Simoens P, Lauwers H. Tubular contents of equine dentin: a scanning electron microscopic study. J Vet Med A 2000; 47(6): 321–30.

Nalla RK, Porter AE, Daraio C, et al. Ultrastructural examination of dentin using focused ion-beam cross-sectioning and transmission electron microscopy. Micron 2005; 36(7/8): 672–80.

Nanci A. Ten Cate's oral histology: development, structure and function. 8th ed. St. Louis: Mosby, 2013: 165– 204.

Ohsaki Y, Nagata K. Type III collagen is a major component of interodontoblastic fibers of the developing mouse molar root. Anat Rec 1994; 240(3): 308–13.

Ottani V, Raspanti M, Ruggeri A. Collagen structure and functional implications. Micron 2001; 32(3): 251–60.

Palamara JE, Wilson PR, Thomas CD, Messer HH. A new imaging technique for measuring the surface strains applied to dentine. J Dent 2000; 28(2): 141–6.

Pashley DH. Dentin: a dynamic substrate: a review. Scanning Microsc 1989; 3(1): 161–74; discussion 174–6.

Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. Crit Rev Oral Biol Med 1996; 7(2): 104–33.

Pashley DH, Andringa HJ, Derkson GD, Derkson ME, Kalathoor SR. Regional variability in the permeability of human dentine. Arch Oral Biol 1987; 32(7): 519–23.

Pashley D, Okabe A, Parham P. The relationship between dentin microhardness and tubule density. Endod Dent Traumatol 1985; 1(5): 176–9.

Pence P. Equine dentistry: a practical guide.
Baltimore: Lippincot Williams & Wilkins, 2002: 1–24.

Plate U, Höhling HJ, Reimer L, et al. Analysis of the calcium distribution in predentine by EELS and of the early crystal formation in dentine by ESI and ESD. J Microsc 1992; 166(3): 329–41.

Popowics TE, Herring SW. Teeth, jaws and muscles in mammalian mastication. In: Bels VL. Feeding in domestic vertebrates: from structure to behaviour.
Wallingford: CABI Publication, 2006: 61–79.

Popowics TE, Rensberger JM, Herring SW. The fracture behaviour of human and pig molar cusps. Arch Oral Biol 2001; 46(1): 1–12.

Pugach MK, Strother J, Darling CL, et al. Dentin caries zones: mineral, structure, and properties. J Dent Res 2009; 88(1): 71–6.

Qin QH, Swain MV. A micro-mechanics model of dentin mechanical properties.
Biomaterials 2004; 25(20): 5081–90.

Qin Z, Gautieri A, Nair AK, Inbar H, Buehler MJ. Thickness of hydroxyapatite nanocrystal controls mechanical properties of the collagen-hydroxyapatite interface.
Langmuir 2012; 28(4): 1982–92.

Reitan K, Kvam E. Comparative behavior of human and animal tissue during experimental tooth movement. Angle Orthod 1971; 41: 1–14.

Robb L, Marx J, Steenkamp G, van Heerden WF, Pretorius E, Boy SC. Scanning electron microscopic study of the dentinal tubules in dog canine teeth. J Vet Dent 2007; 24(2): 86–9.

Romagnoli P, Mancini G, Galeotti F, Francini E, Pierleoni P. The crown odontoblasts of rat molars from primary dentinogenesis to complete eruption.
J Dent Res 1990; 69(12): 1857–62.

Ruch JV. Determinisms of odontogenesis. Revis Biol Celular 1987; 14: 1–99.

Ruch JV, Lesot H, Bègue-Kirn C. Odontoblast differentiation.
Int J Dev Biol 1995; 39(1): 51–68.

Ryou H, Amin N, Ross A, et al. Contributions of microstructure and chemical composition to the mechanical properties of dentin. J Mater Sci Mater Med 2011; 22(5): 1127–35.

Saber-Samandari S, Gross KA. Micromechanical properties of single crystal hydroxyapatite by nanoindentation. Acta Biomater 2009; 5: 2206–12.

Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentin by scanning electron microscopic investigation. Arch Oral Biol 2000; 45(5): 355–61.

Schramm DU, Rossi AM. EPR and ENDOR studies on CO_2^- radicals in γ-irradiated B-type carbonated apatites. Phys Chem Chem Phys 2000; 2: 1339–43.

Schroeder L, Frank RM. High-resolution transmission electron microscopy of adult human peritubular dentine. Cell Tissue Res 1985; 242(2): 449–51.

Skalerič U, Cevc P, Gašpirc B, Schara M. Crystallite arrangement of hydroxyapatite microcrystals in human tooth cementum as revealed by electron paramagnetic resonance (EPR). Eur J Oral Sci 1998; 106 (suppl 1): 365–7.

Smith MM, Hall BK. A developmental model for evolution of the vertebrate exoskeleton and teeth: the role of cranial and trunk neural crest. Evol Biol 1993; 27: 387–448.

Sögaard-Pedersen B, Boye H, Matthiessen ME. Scanning electron microscope observations on collagen fibers in human dentin and pulp. Scand J Dent 1990; 98(2): 89–95.

Stratmann U, Schaarschmidt K, Wiesmann HP, Plate U, Höhling HJ, Szuwart T. The mineralization of mantle dentine and of circumpulpal dentine in the rat: an ultrastructural and element-analytical study. Anat Embryol (Berl) 1997; 195(3): 289–97.

Takagi Y, Fujisawa R, Sasaki S. Identification of dentin phosphophoryn localization by histochemical stainings. Connect Tissue Res 1986; 14(4): 279–92.

Takahashi T, Hayakawa F, Kumagai M, Akiyama Y, Kohyama K. Relations among mechanical properties, human bite parameters, and ease of chewing of solid foods with various textures. J Food Eng 2009; 95(3): 400–9.

Tanaka S. An electron–microscopic observation on the collagen fibril arrangement in the outermost layer of dog dentine as revealed by tangential sections.
Shika Kiso Igakkai Zasshi 1989; 31(6): 724–30.

Tesch W, Eidelman N, Roschger P, Goldenberg F, Klaushofer K, Fratzl P. Graded microstructure and mechanical properties of human crown dentin.
Calcif Tissue Int 2001; 69(3): 147–57.

Thesleff I. Tooth development. Dent Update 1991; 18(9): 382–4, 386–7.

Toit ND, Bezensek B, Dixon PM. Comparison of the microhardness of enamel, primary and regular secondary dentine of the incisors of donkeys and horses.
Vet Rec 2008; 162(9): 272–5.

Tziafas D. Dentinogenic potential of the dental pulp: facts and hypotheses.
Endod Topics 2007; 17(1): 42–64.

Van Meerbeeck B, Inokoshi S, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Morphological aspects of the resin-dentin interdiffusion zone with different dentin adhesive systems.
J Dent Res 1992; 71: 1530–40.

Vasiliadis L, Darling AI, Levers BG. The amount and distribution of sclerotic human root dentine. Arch Oral Biol 1983; 28(7): 645–9.

Verdelis K, Lukashova L, Wright JT, et al. Maturational changes in dentin mineral properties. Bone 2007; 40(5): 1399–407.

Viswanath B, Raghavan R, Ramamurty U, Ravishankar N. Mechanical properties and anisotropy in hydroxyapatite single crystals. Scri Mater 2007; 57(4): 361–4.

Vollmerhaus B, Roos H, Quecke A. Über die biologische Wertigkeit der Bewegung im Kiefergelenk von Schäferhund und Hauskatze. Tierarztl Prax 1996; 24: 73–8.

Vongsavan N, Matthews B. Fluid flow through cat dentine in vivo.
Arch Oral Biol 1992; 37(3): 175–85.

Wang R. Anisotropic fracture in bovine root and coronal dentin.
Dent Mater 2005; 21(5): 429–36.

Wang R, Weiner S. Human root dentin: structural anisotropy and Vickers microhardness isotropy. Connect Tissue Res 1998; 39(4): 269–79.

Weaver ME, Sorenson FM, Jump EB. The miniature pig as an experimental animal in dental research. Arch Oral Biol 1962; 7: 17–23.

Weiner S, Veis A, Beniash E, et al. Peritubular dentin formation: crystal organization and the macromolecular constituents in human teeth. J Struct Biol 1999; 126(1): 27–41.

Weiner S, Wagner HD. The material bone: structure-mechanical function relations.
Ann Rev Mater Sci 1998; 28: 271–98.

Wiesmann HP, Meyer U, Plate U, Höhling HJ. Aspects of collagen mineralization in hard tissue formation. Int Rev Cytol 2005; 242: 121–56.

Wood JD, Wang R, Weiner S, Pashley DH. Mapping of tooth deformation caused by moisture change using moiré interferometry. Dent Mater 2003; 19(3): 159–66.

Xu C, Wang Y. Chemical composition and structure of peritubular and intertubular human dentin revisited. Arch Oral Biol 2012; 57(4): 383–91.

Xue J, Zavgorodniy AV, Kennedy BJ, Swain MV, Li W. X-ray microdiffraction, TEM characterization and texture analysis of human dentin and enamel.
J Microsc 2013; 251(2): 144–53.

Yamakoshi Y, Lu Y, Hu JC, et al. Porcine dentin sialophosphoprotein: length polymorphisms, glycosylation, phosphorylation, and stability. J Biol Chem 2008; 283(21): 14835–44.

Yoshiyama M, Noiri Y, Ozaki K, Uchida A, Ishikawa Y, Ishida H. Transmission electron microscopic characterization of hypersensitive human radicular dentin.
J Dent Res 1990; 69(6): 1293–7.

Zamiri A, De S. Mechanical properties of hydroxyapatite single crystals from nanoindentation data. J Mech Behav Biomed Mater 2011; 4(2): 146–52.

Zaslansky P, Zabler S, Fratzl P. 3D variations in human crown dentin tubule orientation: a phase-contrast microtomography study. Dent Mater 2010; 26(1): e1–10.
http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/-S010956410900311X (14. april 2014)

Zavgorodniy AV, Rohanizadeh R, Swain MV. Ultrastructure of dentine carious lesions.
Arch Oral Biol 2008; 53(2): 124–32.

Zheng J, Zhou ZR, Zhang J, Li H, Yu HY. On the friction and wear behaviour of human tooth enamel and dentin. Wear 2003; 255(7): 967–74.

Ziskind D, Hasday M, Cohen SR, Wagner HD. Young's modulus of peritubular and intertubular human dentin by nano-indentation tests. J Struct Biol 2011; 174(1): 23–30.

Zolotarev VM, Grisimov VN. Architectonics and optical properties of dentin and dental enamel. Opt Spectrosc 2001; 90(5): 753–9.

Zweier JL, Kuppusamy P. *In vivo* EPR spectroscopy of free radicals in the heart.
Environ Health Perspect 1994; 102 (Suppl 10): 45–51.

11 PRILOGE

11.1 Odločba za izjemno uporabo živalskih stranskih proizvodov kategorije 1 (zob evtanaziranih psov)

REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA KMETIJSTVO, GOZDARSTVO IN PREHRANO
VETERINARSKA UPRAVA RS
OBMOČNI URAD LJUBLJANA

Dunajska cesta 22, 1000 Ljubljana
Telefon: 01 234 45 50, telefaks: 01 234 45 70
www.sigov.si/vurs/ e-pošta: OU-Ljubljana.VURS@gov.si

Številka: 34453-13/2011/3
Datum: 28.01.2011

Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Veterinarska uprava Republike Slovenije, izdaja na zahtevo stranke na podlagi 77. člena Zakona o veterinarskih merilih skladnost, v nadaljevanju – ZVMS (Uradni list RS, št. 93/05) v upravni zadevi registracije uporabnika za izjemno uporabo živalskih stranskih proizvodov kategorije 1 (v nadaljevanju ŽSP kat. 1) v raziskovalne namene, stranki UL-Veterinarski fakulteti, Kliniki za kirurgijo in male živali, Cesta v Mestni log 47, 1000 Ljubljana, naslednjo

O D L O Č B O

1. Uporabniku UL-Veterinarski fakulteti, Kliniki za kirurgijo in male živali, Cesta v Mestni log 47, 1000 Ljubljana, ki je pri VURS, OU Ljubljana vpisan v register uporabnikov za izjemno uporabo ŽSP pod številko **SI–B-07-22-13** se s to odločbo dovoli :

   - izjemna uporaba ŽSP kat. 1 (zob evtanaziranih psov) iz vmesnega obrata kat. 1 UL-Veterinarska fakulteta, NVI, Agrokombinatska 80, 1000 Ljubljana,

   v raziskovalne namene.

2. Ta odločba stopi v veljavo takoj.

5. Pritožba proti tej odločbi ne zadrži njene izvršitve.

O b r a z l o ž i t e v:

Na VURS, OU Ljubljana smo dne 21.01.2011 prejeli vlogo, stranke UL-Veterinarska fakulteta, Klinika za kirurgijo in male živali, Cesta v Mestni log 47, 1000 Ljubljana. Iz vloge je razvidno, da bodo prevzete zobe evtanaziranih psov (ŽSP kat. 1) iz vmesnega obrata – secirnice UL, Veterinarska fakulteta, NVI, Agrokombinatska 80, 1000 Ljubljana, uporabljali v raziskovalne namene.
V prvem odstavku 23. člena Uredbe (ES) št. 1774/02 Evropskega parlamenta in Sveta o določitvi zdravstvenih pravil za živalske stranske proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi

(UL L 273, z dne 10.10.2002) je določeno, da lahko države članice odobrijo, pod nadzorom pristojnih organov uporabo ŽSP v diagnostične, izobraževalne in raziskovalne namene.
Pristojna pri odločanju o predmetni zadevi je Veterinarska uprava Republike Slovenije, Območni urad Ljubljana, v skladu s 1. odstavkom 77. člena ZVMS in 1. točko 12. člena Uredbe o izvajanju Uredbe (ES) o določitvi zdravstvenih pravil za živalske stranske proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi, in njenih izvedbenih predpisov Skupnosti in določitvi prekrškov za kršitve njenih določb (Uradni list RS, št. 100/06).
Pritožba proti tej odločbi ne zadrži izvršitve je v skladu z 2. odstavkom, 92. člena ZVMS.

Odločba je izdana na podlagi vloge stranke, vendar v skladu s 23. členom Zakona o upravnih taksah, v nadaljevanju ZUT (Uradni list RS, št. 106/10-UPB5) se upravna taksa ne plača.

Pouk o pravnem sredstvu: Zoper to odločbo je dovoljena pritožba v roku 8 dni od vročitve odločbe na Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Dunajska 22, Ljubljana. Pritožba se odda pisno ali ustno na zapisnik pri organu, ki je odločbo izdal na prvi stopnji (VURS, OU Ljubljana, Dunajska 22, Ljubljana). Pritožbi je potrebno predložiti dokazilo o vplačilu zneska 15,49 EUR upravne takse po tarifni številki 2 ZUT, ki se nakaže na račun št. 01100 1000315637, referenca 11 23124-7111002, na naslov Upravne takse-državne, Slovenska cesta 54, Ljubljana.

Odločbo pripravila:

Damjana Demšar, dr.vet.med.
Uradna veterinarka I

REPUBLIKA SLOVENIJA MINISTRSTVO ZA KMETIJSTVO, GOZDARSTVO IN PREHRANO Veterinarska uprava Republike Slovenije 217 LJUBLJANA

Odločbo izdala:

Smiljana Verbič, dr.vet.med.
direktorica območnega urada

VROČENO:
1. stranki
2. spis

V vednost:
1. VURS, glavni urad
2. UL, Veterinarska fakulteta, NVI, Agrokombinatska 80, 1000 Ljubljana

11.2 Odločba za izjemno uporabo živalskih stranskih proizvodov kategorije 3 (zob prašičev in kopitarjev)

REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA KMETIJSTVO, GOZDARSTVO IN PREHRANO
VETERINARSKA UPRAVA RS
OBMOČNI URAD LJUBLJANA

Dunajska cesta 22, 1000 Ljubljana
Telefon: 01 234 45 50, telefaks: 01 234 45 70
www.sigov.si/vurs/ e-pošta: OU-Ljubljana.VURS@gov.si

Številka: 34453-13/2011/2
Datum: 28.01.2011

Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Veterinarska uprava Republike Slovenije, izdaja na zahtevo stranke na podlagi 77. člena Zakona o veterinarskih merilih skladnost, v nadaljevanju – ZVMS (Uradni list RS, št. 93/05) v upravni zadevi registracije uporabnika za izjemno uporabo živalskih stranskih proizvodov kategorije 3 (v nadaljevanju ŽSP kat. 3) v raziskovalne namene, stranki UL-Veterinarski fakulteti, Kliniki za kirurgijo in male živali, Cesta v Mestni log 47, 1000 Ljubljana, naslednjo

O D L O Č B O

1. Stranki UL-Veterinarski fakulteti, Kliniki za kirurgijo in male živali, Cesta v Mestni log 47, 1000 Ljubljana, se dovoli uporaba ŽSP kat. 3 v raziskovalne namene.

2. Uporabniku ŽSP kat. 3 iz prve točke izreka se določi uradna številka **SI–B-07-22-13** in se ga vpiše v register, ki se vodi pri VURS, OU Ljubljana.

3. Uporabniku s številko SI–B-07-22-13 se s to odločbo dovoli :

   - izjemna uporaba ŽSP kat. 3 (zob prašičev in kopitarjev) iz klavnic Meso Kamnik d.o.o., Korenova cesta 9, 1241 Kamnik in Postojnske mesnine d.o.o., Pot k Pivki 2, 6230 Postojna,

   v raziskovalne namene.

4. Ta odločba stopi v veljavo takoj.

5. Pritožba proti tej odločbi ne zadrži njene izvršitve.

O b r a z l o ž i t e v

Na VURS, OU Ljubljana smo dne 21.01.2011 prejeli vlogo, stranke UL-Veterinarska fakulteta, Klinika za kirurgijo in male živali, Cesta v Mestni log 47, 1000 Ljubljana, v kateri se stranka želi registrirati kot uporabnik živalskih stranskih proizvodov za namene iz 23. člena Uredbe (ES) št. 1774/02 Evropskega parlamenta in Sveta o določitvi zdravstvenih pravil za živalske stranske proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi (UL L 273, z dne 10.10.2002). Iz vloge je razvidno, da bodo prevzete ŽSP kat. 3 – zobe prašičev in kopitarjev, iz klavnic Meso Kamnik d.o.o., Korenova cesta 9, 1241 Kamnik in Postojske mesnine d.o.o., Pot k Pivki, 6230 Postojna, uporabljali v raziskovalne namene. Vlogi sta bila priložena tudi pisni soglasji klavnic, ki sta navedeni v izreku odločbe, da dovoljujejo oddajo ŽSP kat. 3 Veterinarski fakulteti, Cesta v Mestni log 47, Ljubljana.
V prvem odstavku 23. člena Uredbe (ES) št. 1774/02 Evropskega parlamenta in Sveta o določitvi zdravstvenih pravil za živalske stranske proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi (UL L 273, z dne 10.10.2002) je določeno, da lahko države članice odobrijo, pod nadzorom pristojnih organov uporabo ŽSP v diagnostične, izobraževalne in raziskovalne namene.
Pristojni organ je skladno s 8. členom Uredbe o izvajanju Uredbe (ES) o določitvi zdravstvenih pravil za živalske stranske proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi, in njenih izvedbenih predpisov Skupnosti in določitvi prekrškov za kršitve njenih določb (Uradni list RS, št. 100/06) stranki dodelil številko SI-B-07-22-13.
Pristojna pri odločanju o predmetni zadevi je Veterinarska uprava Republike Slovenije, Območni urad Ljubljana, v skladu s 1. odstavkom 77. člena ZVMS in 1. točko 12. člena Uredbe o izvajanju Uredbe (ES) o določitvi zdravstvenih pravil za živalske stranske proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi, in njenih izvedbenih predpisov Skupnosti in določitvi prekrškov za kršitve njenih določb (Uradni list RS, št. 100/06).
Pritožba proti tej odločbi ne zadrži izvršitve je v skladu z 2. odstavkom, 92. člena ZVMS.

Odločba je izdana na podlagi vloge stranke, vendar v skladu s 23. členom Zakona o upravnih taksah, v nadaljevanju ZUT (Uradni list RS, št. 106/10-UPB5) se upravna taksa ne plača.

Pouk o pravnem sredstvu: Zoper to odločbo je dovoljena pritožba v roku 8 dni od vročitve odločbe na Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Dunajska 22, Ljubljana. Pritožba se odda pisno ali ustno na zapisnik pri organu, ki je odločbo izdal na prvi stopnji (VURS, OU Ljubljana, Dunajska 22, Ljubljana). Pritožbi je potrebno predložiti dokazilo o vplačilu zneska 15,49 EUR upravne takse po tarifni številki 2 ZUT, ki se nakaže na račun št. 01100 1000315637, referenca 11 23124-7111002, na naslov Upravne takse-državne, Slovenska cesta 54, Ljubljana.

Odločbo pripravila:

Damjana Demšar, dr.vet.med.
Uradna veterinarka I

REPUBLIKA SLOVENIJA MINISTRSTVO ZA KMETIJSTVO, GOZDARSTVO IN PREHRANO Veterinarska uprava Republike Slovenije 217 LJUBLJANA

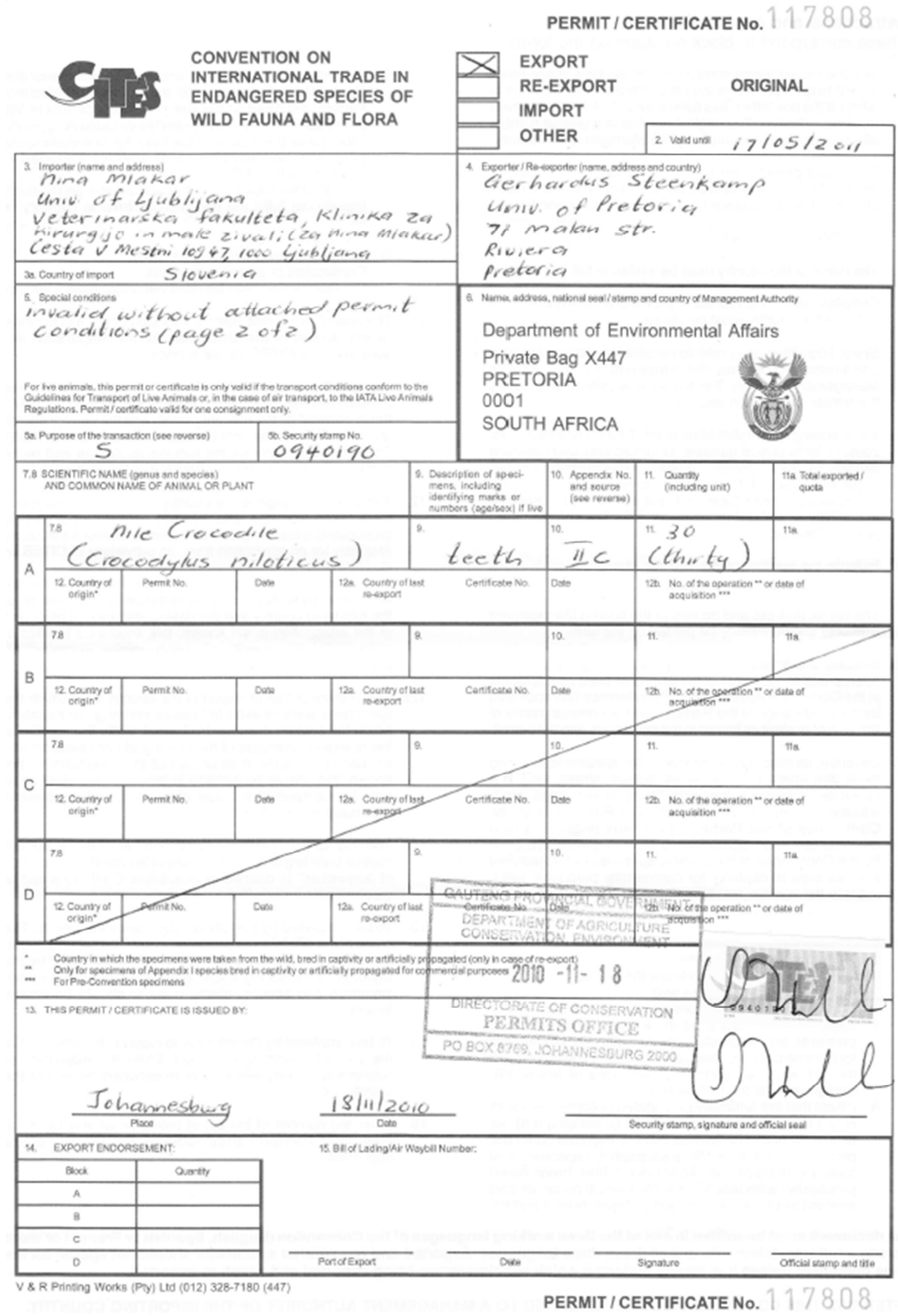
Odločbo izdala:

Smiljana Verbič, dr.vet.med.
direktorica območnega urada

VROČENO:
1. stranki
2. spis

V vednost:
1. VURS, glavni urad
2. uradnemu veterinarju v klavnici:
- Meso Kamnik d.o.o., Korenova 9, 1241 Kamnik
- Postojnske mesnine d.o.o., Pot k Pivki 2, 6230 Postojna
3. Meso Kamnik d.o.o., Korenova 9, 1241 Kamnik,
Postojnske mesnine d.o.o., Pot k Pivki 2, 6230 Postojna,

11.3 Izvozno in uvozno dovoljenje za zobe krokodila



PERMIT / CERTIFICATE No. 117808

CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA

☒ EXPORT
☐ RE-EXPORT
☐ IMPORT
☐ OTHER

ORIGINAL

2. Valid until 17/05/2011

3. Importer (name and address)
Nina Mlakar
Univ of Ljubljana
Veterinarska fakulteta, Klinika za kirurgijo in male živali (za Nina Mlakar)
Cesta V Mestni log 47, 1000 Ljubljana

3a. Country of import Slovenia

4. Exporter / Re-exporter (name, address and country)
Gerhardus Steenkamp
Univ. of Pretoria
71 Makan str.
Riviera
Pretoria

5. Special conditions
invalid without attached permit conditions (page 2 of 2)

For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport of Live Animals or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations. Permit / certificate valid for one consignment only.

5a. Purpose of the transaction (see reverse) S

5b. Security stamp No. 0940190

6. Name, address, national seal / stamp and country of Management Authority
Department of Environmental Affairs
Private Bag X447
PRETORIA
0001
SOUTH AFRICA

	7.8 SCIENTIFIC NAME (genus and species) AND COMMON NAME OF ANIMAL OR PLANT	9. Description of specimens, including identifying marks or numbers (age/sex) if live	10. Appendix No. and source (see reverse)	11. Quantity (including unit)	11a. Total exported / quota
A	7.8 Nile Crocodile (Crocodylus niloticus)	9. teeth	10. II C	11. 30 (thirty)	11a.
B	7.8	9.	10.	11.	11a.
C	7.8	9.	10.	11.	11a.
D	7.8	9.	10.	11.	11a.

	12. Country of origin*	Permit No.	Date	12a. Country of last re-export	Certificate No.	Date	12b. No. of the operation ** or date of acquisition ***
A							
B							
C							
D							

* Country in which the specimens were taken from the wild, bred in captivity or artificially propagated (only in case of re-export)
** Only for specimens of Appendix I species bred in captivity or artificially propagated for commercial purposes
*** For Pre-Convention specimens

GAUTENG PROVINCIAL GOVERNMENT
DEPARTMENT OF AGRICULTURE
CONSERVATION, ENVIRONMENT
2010 -11- 18
DIRECTORATE OF CONSERVATION
PERMITS OFFICE
PO BOX 8769, JOHANNESBURG 2000

13. THIS PERMIT / CERTIFICATE IS ISSUED BY:

Johannesburg (Place) 18/11/2010 (Date) Security stamp, signature and official seal

14. EXPORT ENDORSEMENT:

Block	Quantity
A	
B	
C	
D	

15. Bill of Lading/Air Waybill Number:

Port of Export | Date | Signature | Official stamp and title

V & R Printing Works (Pty) Ltd (012) 328-7180 (447)

PERMIT / CERTIFICATE No. 117808

CONDITIONS FOR PERMIT NO./s ..... 117808 ..... **Page 2**

PERMIT CONDITIONS FOR THE NATIONAL/ INTERNATIONAL IMPORT, EXPORT OR RE-EXPORT OF CITES AND NON-CITES SPECIES AND ANY PRODUCTS THEREOF; NON-CITES LIVE WILD ANIMALS, LIVE EXOTIC ANIMALS, HUNTING TROPHIES, WILD ANIMAL PRODUCTS, PROTECTED PLANTS AND LIVE FISH

These conditions will be applicable to all National/ International Imports, Exports and Re-Exports of CITES and Non-CITES species and any products thereof; live wild animals, live exotic animals, hunting trophies, wild animal products, protected plants and live fish by air, mail, rail and road within the Gauteng Province of which the first port of entry into and/ or the last port of exit out of the Province of Gauteng/ South Africa will be OR Tambo International Airport.

Import permits are not valid unless the imported consignment is accompanied by a valid ***(original)*** export permit from the country/ province of origin ***(if required),*** which must be handed to the authorized Environmental Management Inspector on inspection.

THE FOLLOWING CONDITIONS ARE APPLICABLE TO:

(A) ALL NATIONAL/ INTERNATIONAL IMPORTS, EXPORTS AND RE-EXPORTS OF CITES AND NON-CITES SPECIES AND ANY PRODUCTS THEREOF; LIVE WILD ANIMALS, LIVE EXOTIC ANIMALS, HUNTING TROPHIES, WILD ANIMAL PRODUCTS, PROTECTED PLANTS AND LIVE FISH (INCLUDING AIR, MAIL, RAIL, ROAD)

THIS PERMIT:

1. a) Shall not be transferable;
   b) Shall be invalid until the signature of the holder/ Recipient thereof been appended thereto;
   c) This permit is not valid unless it has been endorsed and released by an authorized Environmental Management Inspector/ official prior to the import, export or re-export taking place. In cases of importation of live animals, which are to be quarantined at OR Tambo International Airport's Quarantine Station, the permit must be released prior to the animals leaving quarantine. Original import permits to be inserted into a sealed envelope and placed in the Environmental Management Inspector box that's provided at the quarantine station, no more than 14 working days after import;
   d) Shall be subject to the provisions of any other law and or regulation;
   e) Shall be valid for one consignment only;
   f) This permit is subject to the compliance of Veterinary and Agricultural requirements; and to the compliance of IATA Live Animal Regulations.

2. The permit holder or his delegated agent must contact one of the authorized Environmental Management Inspector/ officials, per telephone ***and*** confirm per fax a minimum of ***48 hours*** prior to the import, export or re-export taking place to book an inspection (the inspection booking must be requested a minimum of 48 hours prior to the intended inspection), applicable for shipments done over weekends and public holidays, with the following information:
   a) Name / Company Name of Importer / Exporter;
   b) Name of Airline and Warehouse where intended inspection will take place;
   c) Date and Time of Import / Export / Re-Export;
   d) Date and Time of intended inspection (subject to approval);
   e) Agents particulars (if applicable), Carrier Name, Flight Number, Flight Time and Waybill Number;
   f) The applicable permit number/s and relevant expiry dates; and
   g) Detailed packing list as per condition 7.

3. Inspections are by appointment only and early booking is necessary. An authorized Environmental Management Inspector/ official may be contacted at the following telephone numbers during office hours ***(07:00 – 15:30):***
   Office: +27 (11) 390-3687/ 2311
   Fax: +27 (11) 390-1720

4. All relevant documentation, including ***original*** permit/s ***(CITES permits must include original and coloured copy)***, Packing List/s, Waybill/s and Bill of entry/s (SAD/ DA 550) must be presented for inspection. A photo copy of all these documents must also be handed to the Environmental Management Inspector/ official on inspection. The original permit/s, these conditions and packing list/s must accompany the consignment/s.

5. All transport containers must be numbered and the numbers must coincide with the numbers on the packing list/s. The country/ province of destination as shown on the containers must coincide with the country/ province of destination as on the permit. The details on the packing list/s must coincide with the details on the permit/s and Waybill/s.

6. Detailed packing list/s, that are signed and dated must accompany the consignment/s, with the following information:
   a) Details of Importer and Exporter (Names, addresses and contact numbers);
   b) Waybill number/s and name of carrier, flight number, date and time;
   c) Transport container number/s;
   d) Scientific name of species (in full) with relevant transponder / tag / ring numbers; a detailed description of specimen / product and the origin thereof;
   e) Common name of species (in full);
   f) Number per species per container (actual number exported / imported); and
   g) Applicable permit number/s

7. If this permit is not used, the ***original permit (CITES permits must include coloured copy)*** must be returned to the issuing authority within ***14 working*** days after expiry thereof. Import permits must be returned to the issuing authority within ***14 working days*** after use. Export permits must be handed to a Management Authority of the importing country/ province within ***14 working days*** after use.

8. The permit holder must make and retain photo copies of permit/s for audit inspections. Copies of import permits must be made and retained ***after endorsement,*** for Re-export permit applications. When applying for a Re-export permit, a copy of the ***endorsed import permit*** must be submitted to the Permit office with the application.

9. A person authorized thereto by the Premier may only make any alteration on the permit.

10. Failure to comply with any of the permit conditions renders the permit invalid and may result in criminal proceedings, cancellation of the permit/s and seizure of the consignment/s.

11. The holder of the permit and / or his/ her delegated agent will be held responsible for any legal costs; costs incurred for delays and / or storage fees due to irregularities and / or due to the consignment being withheld due to incorrect documentation, and / or incorrect consignment/s and / or failure to comply with permit conditions.

12. Permit holders or their delegated agents must inform the Environmental Management Inspector/ official if an inspection is cancelled, or if they are to be late for an inspection within a reasonable time before the inspection is due to take place.

GAUTENG PROVINCIAL GOVERNMENT
DEPARTMENT OF AGRICULTURE, CONSERVATION, ENVIRONMENT
2010 -11- 18
DIRECTORATE OF CONSERVATION
PERMITS OFFICE
PO BOX 8769, JOHANNESBURG 2000

Signature of Issuing Officer ..... Date .....

O S TSHOLOBI
Full Name .....

Signature of Recipient ..... Date .....

Full Name .....

Conditions to this permit been issued subject to the provisions of section 100 (2), Ordinance 12 of 1983

ORDINARY PERMIT

(Issued in terms of the provisions of the National Environment Management: Biodiversity Act 2004, Act 10 of 2004)

PERMIT NUMBER: 0 0916

NAME OF ISSUING AUTHORITY	
NAME	GDARD
ADDRESS	73 Market Street
	Glencairn building
PROVINCE	Gauteng

DETAILS OF PERMIT HOLDER			
NAME	Gerhardus	ID NO.	6610155111081
SURNAME	Steenkamp	PASSPORT NO.	
	POSTAL ADDRESS		RESIDENTIAL ADDRESS
ADDRESS	Private Bag X04		71 Malan Street
ADDRESS			Riviera
ADDRESS	Onderstepoort		Pretoria
TOWN			
POSTAL CODE	0110		
PROVINCE	Gauteng		Gauteng

PROPERTY WHERE RESTRICTED ACTIVITIES WILL BE CARRIED OUT	
NAME AND SURNAME OF APPLICANT	Gerhardus Steenkamp
NAME AND SURNAME: RESPONSIBLE PERSON	
NAME AND SURNAME: OF AGENT	
PHYSICAL ADDRESS OF FACILITY	Dental and Maxillofacial Surgery Clinic
PHYSICAL ADDRESS OF FACILITY	Onderstepoort, Vet. Academic Hospital
DISTRICT	Faculty of Veterinary Science, Univ. of Pta
PROVINCE	Gauteng
REGISTERED NAME AND NUMBER (in the case of game farm)	

DETAILS OF SPECIES INVOLVED				
SPECIES		SEX (if known)	QUANTITY	MARKING (if applicable)
COMMON NAME	SCIENTIFIC NAME			
Nile Crocodile	(Crocodylus niloticus)		30(thirty)	teeth

DETAILS OF RESTRICTED ACTIVITIES INVOLVED	
transport, export	TO: Veterinarska fakulteta Klinika za kirurgijo in male živali (za Nino Mlakar) Cesta v Mestni log 47 1000 Ljubljana, Slovenija

NAME AND SURNAME OF PURCHASER/SELLER	
RESIDENTIAL ADDRESS OF PURCHASER/SELLER	

IN THE CASE OF INTERNATIONAL IMPORT/EXPORT:	
NAME AND SURNAME OF CONSIGNEE/CONSIGNOR	Gerhardus Steenkamp
RESIDENTIAL ADDRESS OF CONSIGNEE/CONSIGNOR	71 Malan Street, Riviera, Pretoria

IN THE CASE OF A HUNT:	
NAME AND SURNAME OF HUNTING C	
NAME AND SURNAME OF PROFESSIO	
NAME AND SURNAME OF HUNTING O	
WEAPON AND METHOD OF HUNTING	

This permit is invalid without attached permit conditions (page 2 of 2)

IN THE CASE OF POSSESSION OF ELEPHANT IVORY OR RHINOCEROS HORN:	
WEIGHT OF EACH PIECE APPLIED FOR	
LENGTH OF THE ELEPHANT IVORY	
BASE CIRCUMFERENCE OF ELEPHANT IVORY OR RHINOCEROS HORN	
REGISTRATION NUMBER	
MICROCHIP NUMBER	

PERMIT VALIDATION

PERIOD OF VALIDITY	FROM:	TO:	17/05/2011
RECEIPT NUMBER			
SIGNATURE OF ISSUING OFFICER:		SIGNATURE OF PERMIT HOLDER:	
DATE STAMP:	2010 -11- 18		

GAUTENG PROVINCIAL GOVERNMENT
DEPARTMENT OF AGRICULTURE CONSERVATION, ENVIRONMENT
DIRECTORATE OF CONSERVATION
PERMITS OFFICE
PO BOX 8769 JOHANNESBURG 2000

KIMESAMO PRINTING SOLUTIONS 011 496 2540

CONDITIONS FOR PERMIT NO./s O-0916 **Page 2**

PERMIT CONDITIONS FOR THE NATIONAL/ INTERNATIONAL IMPORT, EXPORT OR RE-EXPORT OF CITES AND NON-CITES SPECIES AND ANY PRODUCTS THEREOF; NON-CITES LIVE WILD ANIMALS, LIVE EXOTIC ANIMALS, HUNTING TROPHIES, WILD ANIMAL PRODUCTS, PROTECTED PLANTS AND LIVE FISH

These conditions will be applicable to all National/ International Imports, Exports and Re-Exports of CITES and Non-CITES species and any products thereof; live wild animals, live exotic animals, hunting trophies, wild animal products, protected plants and live fish by air, mail, rail and road within the Gauteng Province of which the first port of entry into and/ or the last port of exit out of the Province of Gauteng/ South Africa will be OR Tambo International Airport.

Import permits are not valid unless the imported consignment is accompanied by a valid ***(original)*** export permit from the country/ province of origin ***(if required),*** which must be handed to the authorized Environmental Management Inspector on inspection.

THE FOLLOWING CONDITIONS ARE APPLICABLE TO:

(A) ALL NATIONAL/ INTERNATIONAL IMPORTS, EXPORTS AND RE-EXPORTS OF CITES AND NON-CITES SPECIES AND ANY PRODUCTS THEREOF; LIVE WILD ANIMALS, LIVE EXOTIC ANIMALS, HUNTING TROPHIES, WILD ANIMAL PRODUCTS, PROTECTED PLANTS AND LIVE FISH (INCLUDING AIR, MAIL, RAIL, ROAD)

THIS PERMIT:

1. a) Shall not be transferable;
   b) Shall be invalid until the signature of the holder/ Recipient thereof been appended thereto;
   c) This permit is not valid unless it has been endorsed and released by an authorized Environmental Management Inspector/ official prior to the import, export or re-export taking place. In cases of importation of live animals, which are to be quarantined at OR Tambo International Airport's Quarantine Station, the permit must be released prior to the animals leaving quarantine. Original import permits to be inserted into a sealed envelope and placed in the Environmental Management Inspector box that's provided at the quarantine station, no more than 14 working days after import;
   d) Shall be subject to the provisions of any other law and or regulation;
   e) Shall be valid for one consignment only;
   f) This permit is subject to the compliance of Veterinary and Agricultural requirements; and to the compliance of IATA Live Animal Regulations.

2. The permit holder or his delegated agent must contact one of the authorized Environmental Management Inspector/ officials, per telephone ***and*** confirm per fax a minimum of ***48 hours*** prior to the import, export or re-export taking place to book an inspection (the inspection booking must be requested a minimum of 48 hours prior to the intended inspection), applicable for shipments done over weekends and public holidays, with the following information:
   a) Name / Company Name of Importer / Exporter;
   b) Name of Airline and Warehouse where intended inspection will take place;
   c) Date and Time of Import / Export / Re-Export;
   d) Date and Time of intended inspection (subject to approval);
   e) Agents particulars (if applicable), Carrier Name, Flight Number, Flight Time and Waybill Number;
   f) The applicable permit number/s and relevant expiry dates; and
   g) Detailed packing list as per condition 7.

3. Inspections are by appointment only and early booking is necessary. An authorized Environmental Management Inspector/ official may be contacted at the following telephone numbers during office hours ***(07:00 – 15:30):***
   Office: +27 (11) 390-3687/ 2311
   Fax: +27 (11) 390-1720

4. All relevant documentation, including ***original*** permit/s ***(CITES permits must include original and coloured copy)***. Packing List/s, Waybill/s and Bill of entry/s (SAD/ DA 550) must be presented for inspection. A photo copy of all these documents must also be handed to the Environmental Management Inspector/ official on inspection. The original permit/s, these conditions and packing list/s must accompany the consignment/s.

5. All transport containers must be numbered and the numbers must coincide with the numbers on the packing list/s. The country/ province of destination as shown on the containers must coincide with the country/ province of destination as on the permit. The details on the packing list/s must coincide with the details on the permit/s and Waybill/s.

6. Detailed packing list/s, that are signed and dated must accompany the consignment/s, with the following information:
   a) Details of Importer and Exporter (Names, addresses and contact numbers);
   b) Waybill number/s and name of carrier, flight number, date and time;
   c) Transport container number/s;
   d) Scientific name of species (in full) with relevant transponder / tag / ring numbers; a detailed description of specimen / product and the origin thereof;
   e) Common name of species (in full);
   f) Number per species per container (actual number exported / imported); and
   g) Applicable permit number/s

7. If this permit is not used, the ***original permit (CITES permits must include coloured copy)*** must be returned to the issuing authority within ***14 working*** days after expiry thereof. Import permits must be returned to the issuing authority within ***14 working days*** after use. Export permits must be handed to a Management Authority of the importing country/ province within ***14 working days*** after use.

8. The permit holder must make and retain photo copies of permit/s for audit inspections. Copies of import permits must be made and retained ***after endorsement,*** for Re-export permit applications. When applying for a Re-export permit, a copy of the ***endorsed import permit*** must be submitted to the Permit office with the application.

9. A person authorized thereto by the Premier may only make any alteration on the permit.

10. Failure to comply with any of the permit conditions renders the permit invalid and may result in criminal proceedings, cancellation of the permit/s and seizure of the consignment/s.

11. The holder of the permit and / or his/ her delegated agent will be held responsible for any legal costs; costs incurred for delays and / or storage fees due to irregularities and / or due to the consignment being withheld due to incorrect documentation, and / or incorrect consignment/s and / or failure to comply with permit conditions.

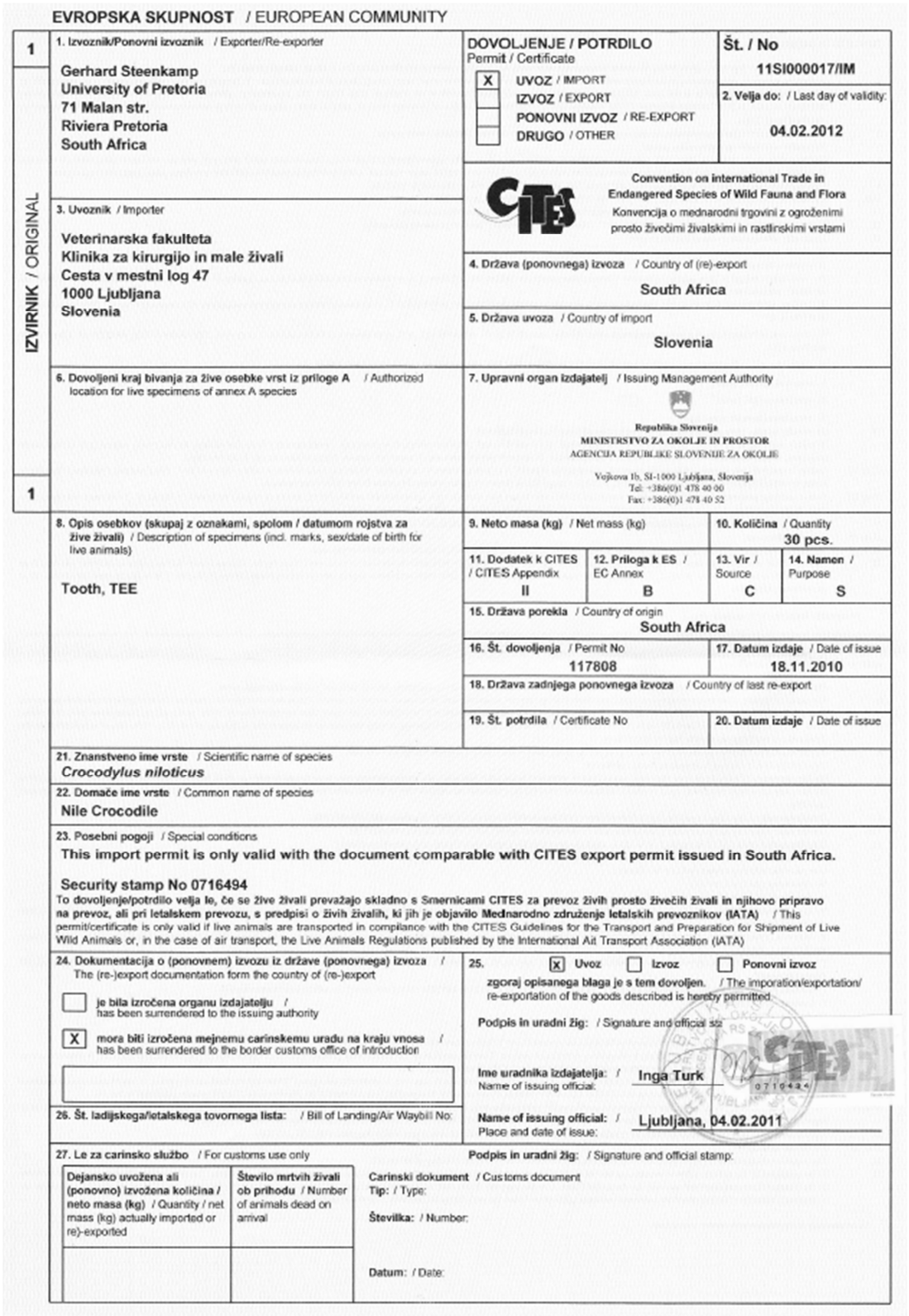
12. Permit holders or their delegated agents must inform the Environmental Management Inspector/ official if an inspection is cancelled, or if they are to be late for an inspection within a reasonable time before the inspection is due to take place.

GAUTENG PROVINCIAL GOVERNMENT
DEPARTMENT OF AGRICULTURE, CONSERVATION, ENVIRONMENT
DIRECTORATE OF CONSERVATION
PERMITS OFFICE
PO BOX 8769, JOHANNESBURG 2000

Potgieter Mapal — 2010 -11- 18 — Signature of Issuing Officer — Date — Signature of Recipient — Date

H. Potgieter M. Gopal — Full Name — Full Name

Conditions to this permit been issued subject to the provisions of section 100 (2), Ordinance 12 of 1983



EVROPSKA SKUPNOST / EUROPEAN COMMUNITY

1 — IZVIRNIK / ORIGINAL — 1

1. Izvoznik/Ponovni izvoznik / Exporter/Re-exporter

Gerhard Steenkamp
University of Pretoria
71 Malan str.
Riviera Pretoria
South Africa

3. Uvoznik / Importer

Veterinarska fakulteta
Klinika za kirurgijo in male živali
Cesta v mestni log 47
1000 Ljubljana
Slovenia

6. Dovoljeni kraj bivanja za žive osebke vrst iz priloge A / Authorized location for live specimens of annex A species

DOVOLJENJE / POTRDILO Permit / Certificate

- [X] UVOZ / IMPORT
- [ ] IZVOZ / EXPORT
- [ ] PONOVNI IZVOZ / RE-EXPORT
- [ ] DRUGO / OTHER

Št. / No 11SI000017/IM

2. Velja do: / Last day of validity: 04.02.2012

Convention on international Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora
Konvencija o mednarodni trgovini z ogroženimi prosto živečimi živalskimi in rastlinskimi vrstami

4. Država (ponovnega) izvoza / Country of (re)-export: South Africa

5. Država uvoza / Country of import: Slovenia

7. Upravni organ izdajatelj / Issuing Management Authority

Republika Slovenija
MINISTRSTVO ZA OKOLJE IN PROSTOR
AGENCIJA REPUBLIKE SLOVENIJE ZA OKOLJE
Vojkova 1b, SI-1000 Ljubljana, Slovenija
Tel: +386(0)1 478 40 00
Fax: +386(0)1 478 40 52

8. Opis osebkov (skupaj z oznakami, spolom / datumom rojstva za žive živali) / Description of specimens (incl. marks, sex/date of birth for live animals)

Tooth, TEE

9. Neto masa (kg) / Net mass (kg)

10. Količina / Quantity: 30 pcs.

11. Dodatek k CITES / CITES Appendix	12. Priloga k ES / EC Annex	13. Vir / Source	14. Namen / Purpose
II	B	C	S

15. Država porekla / Country of origin: South Africa

16. Št. dovoljenja / Permit No: 117808

17. Datum izdaje / Date of issue: 18.11.2010

18. Država zadnjega ponovnega izvoza / Country of last re-export

19. Št. potrdila / Certificate No

20. Datum izdaje / Date of issue

21. Znanstveno ime vrste / Scientific name of species
Crocodylus niloticus

22. Domače ime vrste / Common name of species
Nile Crocodile

23. Posebni pogoji / Special conditions
This import permit is only valid with the document comparable with CITES export permit issued in South Africa.

Security stamp No 0716494

To dovoljenje/potrdilo velja le, če se žive živali prevažajo skladno s Smernicami CITES za prevoz živih prosto živečih živali in njihovo pripravo na prevoz, ali pri letalskem prevozu, s predpisi o živih živalih, ki jih je objavilo Mednarodno združenje letalskih prevoznikov (IATA) / This permit/certificate is only valid if live animals are transported in compliance with the CITES Guidelines for the Transport and Preparation for Shipment of Live Wild Animals or, in the case of air transport, the Live Animals Regulations published by the International Air Transport Association (IATA)

24. Dokumentacija o (ponovnem) izvozu iz države (ponovnega) izvoza / The (re-)export documentation form the country of (re-)export

- [ ] **je bila izročena organu izdajatelju** / has been surrendered to the issuing authority
- [X] **mora biti izročena mejnemu carinskemu uradu na kraju vnosa** / has been surrendered to the border customs office of introduction

26. Št. ladijskega/letalskega tovornega lista: / Bill of Landing/Air Waybill No:

25. [X] Uvoz [ ] Izvoz [ ] Ponovni izvoz

zgoraj opisanega blaga je s tem dovoljen. / The imporation/exportation/ re-exportation of the goods described is hereby permitted.

Podpis in uradni žig: / Signature and official stamp:

Ime uradnika izdajatelja: / Name of issuing official: Inga Turk

Name of issuing official: / Place and date of issue: Ljubljana, 04.02.2011

27. Le za carinsko službo / For customs use only

Podpis in uradni žig: / Signature and official stamp:

Dejansko uvožena ali (ponovno) izvožena količina / neto masa (kg) / Quantity / net mass (kg) actually imported or re)-exported	Število mrtvih živali ob prihodu / Number of animals dead on arrival

Carinski dokument / Customs document
Tip: / Type:
Številka: / Number:
Datum: / Date: