

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
**KATEDRA ANTROPOLOGIE A GENETIKY**  
**ČLOVĚKA**

**Hodnocení sklerotizace dentinových tubulů ve vztahu  
k chronologickému věku jedince – histochemické barvicí  
techniky**

**Evaluation of dentine tubules sclerotization in relation to  
chronological age – histochemical staining methods**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Helena Hakenová**

**Praha 2008**

**Vedoucí diplomové práce: RNDr. Patrik Mottl, Ph.D.**

Prohlašuji, že diplomovou práci jsem vypracovala samostatně s použitím řádně citované literatury.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Halecova', written in a cursive style.

Souhlasím, aby byla práce půjčována ke studijním účelům.

V Praze dne 3. 9. 2008

Na tomto místě bych ráda poděkovala za pomoc, která mi byla při práci na této diplomové práci poskytnuta. V první řadě děkuji svému školiteli, RNDr. Patriku Mottlovi, Ph.D, za odborné vedení a cenné rady, které mi poskytl. Dále děkuji všem, kteří mi poskytli materiál pro tuto diplomovou práci. Můj dík patří MUDr. Pilínovi z Ústavu soudního lékařství a toxikologie UK 1. LF v Praze, MUDr. Mazánkovi ze Stomatologické kliniky 1. LF UK v Praze, MUDr. Šnajdrovi, MUDr. Báčové, MUDr. Novickému a MUDr. Kubelkové. Za pomoc se statistickým vyhodnocením práce děkuji Mgr.Černíkové, Ph.D.

# OBSAH

1. ÚVOD.....	5
2. ZUBNÍ TKÁŇ.....	7
2.1 Stavba lidského chrupu.....	7
2.2 Obecná charakteristika zubu.....	10
2.2.1 Korunka zubu.....	10
2.2.2 Krček zubu.....	10
2.2.3 Kořen zubu.....	10
2.2.4 Dřeňová dutina.....	11
2.2.5 Zubní dřeň.....	11
2.3 Gingiva.....	12
2.4 Jednotlivé zuby stálého chrupu - popis a rozlišení.....	14
2.4.1 Dentes incisivi - řezáky.....	14
2.4.2 Dentes canini - špičáky.....	14
2.4.3 Dentes premolares - třenové zuby.....	14
2.4.4 Dentes molares - stoličky.....	15
2.5 Dočasný chrup.....	15
2.6 Stavba zubu.....	16
2.6.1 Dentin (zubovina, substantia eburnea).....	16
2.6.2 Enamelum (sklovina).....	21
2.6.3 Cementum (cement).....	22
2.6.4 Upevnění zubů v alveolu (periodont).....	23
2.6.5 Alveolus (zubní lůžko).....	24
2.7 Vývoj zubů (odontogeneze).....	24
2.7.1 Vznik dentogingivální lišty.....	25
2.7.2 Vznik zubního pupenu.....	25
2.7.3 Stadium zubní čepičky.....	25
2.7.4 Orgán skloviny.....	26
2.7.5 Vývoj dentinu.....	27
2.7.6 Tvorba skloviny.....	28
2.7.7 Tvorba kořene zubu.....	29
2.7.8 Periodontální membrána a tvorba cementu:.....	30
2.8 Prořezávání zubů - erupce.....	30
2.9 Výměna zubů.....	32
3. METODY ODHADU VĚKU.....	34
3.1 Metody odhadu věku podle zubů.....	34
3.1.1 Mineralizace zubů.....	34
3.1.2 Opotřebenění zubu (abraze).....	35
3.1.3 Atrofie zubních lůžek.....	36
3.1.4 Ztráta zubů.....	36

3.1.5 Histologické metody .....	36
3.1.5.1 Gustafsonova metoda (1947).....	37
3.1.5.2 Počítání cementových linií.....	40
3.1.5.3 Pulpo-dentinový index.....	41
3.1.5.4 Barva kořene jako ukazatel chronologického věku .....	42
3.1.5.5 Poměr D- a L-aspartové kyseliny .....	42
3.1.5.6 Měření šířky dentinu a cementu.....	43
3.1.5.7 Transparence kořenového dentinu .....	43
3.1.5.8 Sklerotizace dentinových tubulů.....	45
4. MATERIÁL.....	47
5. METODIKA .....	50
5.1 Použitá metodika.....	50
5.1.1 Pracovní postup zalévání tvrdých zubních tkání a jejich další zpracování.....	51
5.2 Barvení pomocí histochemických reakcí .....	52
6. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ .....	56
6.1 Jednoduchá lineární regrese.....	56
6.2 Vícenásobná lineární regrese .....	56
6.3 Spearmanův korelační koeficient .....	57
6.4 Stanovení chyby odečtu .....	57
7. VÝSLEDKY.....	58
7.1 Jednoduchá lineární regrese pro chronologický věk.....	60
7.1.1 Model 1 .....	60
7.1.2 Model 2 .....	62
7.1.3 Model 3 .....	63
7.2 Vícenásobná lineární regrese pro chronologický věk.....	65
7.3 Spearmanův korelační koeficient pro chronologický věk .....	65
7.4 Jednoduchá lineární regrese pro korigovaný věk .....	66
7.4.1 Model 5 .....	66
7.4.2 Model 6.....	68
7.4.3 Model 7 .....	69
7.5 Vícenásobná lineární regrese pro korigovaný věk.....	71
7.6 Spearmanův korelační koeficient pro korigovaný věk .....	71
7.7 Výsledek měření absorbance DAB.....	72
7.8 Chyba měření .....	72
8. DISKUSE.....	76
9. ZÁVĚR.....	79
10. SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKALÍ.....	81
11. SEZNAM OBRÁZKŮ.....	82
12. SEZNAM TABULEK A GRAFŮ .....	83
13. POUŽITÁ LITERATURA: .....	84

# 1. ÚVOD

Určení věku u kosterních pozůstatků je jedním ze stěžejních úkolů, jak forenzní antropologie při identifikaci jedinců, tak archeologie. Existuje mnoho metodik odhadu věku. Tyto metodiky používají pro odhad věku různé části kostry a současně jsou různě přesné. Všechny metody jsou založeny na změnách, které se v dané sledované oblasti objevují nebo stupňují s přibývajícím věkem.

Všechny tyto metody lze rozdělit do dvou hlavních skupin. Jednou skupinou jsou makroskopické metody, které vycházejí z makroskopického pozorování vytypovaných částí kostry (např. lebečních švů nebo sternálních konců žeber). Druhou skupinu představují metody histologické. Mezi ně patří např. počítání osteonů na řezu kostí.

Do obou těchto skupin lze zařadit metody používající k odhadu věku zubní tkáň. Metody odhadu věku pomocí zubů jsou obecně považovány za metody patřící mezi přesnější, a to jak u dětí tak u dospělých jedinců.

Mezi makroskopické metody využívající zubní tkáň lze zařadit např. zubní abrazi. Histologické metody jsou představovány hlavně základní Gustafsonovou metodou, která sleduje 6 znaků, které mají souvislost s věkem. Tato metoda je naprostým základem a stala se inspirací pro mnohé další metodiky a autory, kteří na Gustafsonovu práci navázali. Jednou z nejspolehlivějších částí Gustafsonovy metody je měření transparence kořenového dentinu. Tento znak má jednu z nejtěsnějších závislostí na věku ze všech znaků, které Gustafson a jeho následovníci používají k odhadu věku.

V této diplomové práci se zabývám jevem, který je přímou příčinou transparence kořenového dentinu. Jedná se o uzavírání dentinových tubulů minerály. Tento jev probíhá u dospělého člověka po celý život. Vzhledem k tomu, že je tak úzce spjat s transparentí, dá se předpokládat, že i tento jev lze využít k odhadu věku jedince. V rámci této práce jsem se snažila vytvořit co nejpřesnější a současně co nejjednodušší metodiku pro odhad věku jedince pomocí sklerotizace dentinových tubulů.

Cíle této diplomové práce:

1. Sestavit na základě literární rešerše vhodný metodický postup vyhodnocení sklerotizace dentinových tubulů ve vztahu k chronologickému věku jedince.
2. Vyhodnotit rozsah sklerotizace dentinových tubulů v závislosti na chronologickém věku jedince.
3. Provéřit možnost využití některých technik histochemického barvení dekalifikovaných řezů kořenné části zubu.

## 2. ZUBNÍ TKÁŇ

### 2.1 STAVBA LIDSKÉHO CHRUPU

Z fylogenetického hlediska jsou zuby velmi staré struktury. Část zuby má původ epiteliální a část mesenchymální. Jsou usazeny v alveolárních výběžcích horní a dolní čelisti pokrytých dásní (gingivou). Funkcí lidských zubů je uchopování, dělení a rozmělnění potravy a jsou součástí mluvidel. Lze je přirovnat ke kleštím, jejichž ramena vpředu řezou a vzadu drtí. Proto jsou zuby různě tvarované a tím funkčně specializované. Chrup obsahující zuby různých tvarů je označován za chrup heterodontní. (Čihák 2002, Dylevský 2000)

Všechny zuby obou čelistí vytváří chrup (dentici). V průběhu života se u člověka tvoří 2 sady zubů (chrup diphyodontní). Podle doby vzniku rozlišujeme zuby dočasné (dentes decidui) a zuby trvalé (dentes permanentes). Dočasná dentice je tvořena 20 zuby a trvalá dentice 32 zuby. Dočasnou dentici tvoří 8 řezáků (incisivi), 4 špičáky (canini) a 8 stoliček (molares). Trvalá dentice obsahuje navíc 8 zubů třenových (premolars) a 4 stoličky. Řezáky a špičáky označujeme za tzv. přední zuby. Zuby třenové a stoličky jako zuby zadní. (Dylevský 2000, Wolf 1940)

V horní i dolní čelisti jsou zuby seřazeny do oblouků. Oblouk horní čelisti má tvar poloviny elipsy a je označován jako arcus dentalis superior. Oblouk dolní čelisti má tvar paraboly a je označován jako arcus dentalis inferior. Díky odlišnému tvaru zubních oblouků na sebe odpovídající zuby horní a dolní čelisti nenesedají přímo, ale jejich korunky jsou vzájemně mírně posunuty. Přední zuby horní čelisti jsou umístěny před zuby dolní čelisti. Zuby, které mají hrbolky, jsou umístěny tak, že hrbolky dolních zubů zapadají do zářezů mezi hrbolky horních zubů. Zuby horní čelisti se dotýkají analogického zubu dolní čelisti (hlavní antagonista) a v menší míře také vedlejšího zubu dolní čelisti (vedlejší antagonista). Výjimkou jsou horní 3. stolička a dolní 1. řezák, které artikulují pouze s jedním antagonistou. Díky tomuto uspořádání jsou obou oblouky jako celek funkční.

Toto postavení zubů je označováno jako psaliodontie (psaliodontní skus, klešťovitý skus) a u nás je nejběžnější. Zuby mohou být uspořádány i odlišnými způsoby, které nejsou



z hlediska funkce tak výhodné. Může to být např. labiodontie (klešťovitý skus), kdy se o sebe opírají horní a dolní řezáky při skousnutí hranami nebo stegodontie (střechovitý skus), kdy horní řezáky prominují a tvoří nad dolními při skousnutí "stříšku". Toto uspořádání je časté v Japonsku a Číně a neumožňuje ostré ukousnutí sousta. Další možností je progenie, kdy horní řezáky naléhají na lingvální plochu dolních. Z hlediska funkce se nejedná o závažnou poruchu, ale je velmi negativně vnímána z kosmetického hlediska. Vzácné typy skusu jsou opisthodontie (dolní řezáky stojí dále za horními než u psaliodontie) a hiatodontie (mezi horními a dolními řezáky při skusu zůstává mezera a zuby míří proti sobě). (Čihák 2002, Dylevský 2000)

Pro snadnou orientaci se k označení zubů v praxi používá buď jejich značení počátečními písmeny latinských názvů jednotlivých zubů nebo číslicemi.

1 = mesiální řezák

2 = laterální řezák

3 = špičák

4 = první premolár

5 = druhý premolár

6 = první molár

7 = druhý molár

8 = třetí molár

Velkými písmeny a arabskými čísly jsou označovány zuby trvalé. Ke značení zubů dočasného chrupu se používají malá písmena nebo římské číslice (I, II, III, IV, V). Při použití písmen je zub označen písmenem, kterým začíná jeho latinský název a číslicí, která vyjadřuje pořadí zubu ve skupině při pohledu zepředu počítáno od střední čáry.

Trvalá dentice:

I = dentes incisivi = řezáky .....I1, I2

C = dentes canini = špičáky.....C

P = dentes praemolares = třenové zuby.....P1, P2

M = dentes molares = stoličky.....M1, M2, M3

Dočasná dentice:

i = řezáky.....i1, i2

c = špičáky.....c

m = moláry.....m1, m2

K přesnému a přehlednému určení polohy zubů v čelistech se používá zubní kříž. Jedná se o kříž, který horizontálním ramenem odděluje zuby horní a dolní čelisti a vertikální rameno označuje střední čáru. Kříž tak rozděluje celý chrup do 4 kvadrantů. Každý z těchto kvadrantů pak u trvalého chrupu obsahuje 8 zubů a u dočasného 5 zubů. (Čihák 2002, Dylevský 2000)

Pravý horní kvadrant	Levý horní kvadrant
Pravý dolní kvadrant	Levý dolní kvadrant

Na základě těchto vzorců se v praxi používá značení jednotlivých zubů. K označení zubu se pak používá jeho znak, ke kterému se připojí úhlový znak, jehož horizontální úsečka označuje hranici mezi čelistmi a vertikální úsečka, která označuje směr ke středu čelisti. Např. M1 je označení pro první horní stoličku vlevo. Při určování pravé a levé strany se řídíme podle toho, kde je pravá a levá strana pacienta, na jehož chrup se díváme. Další možností je použití pořadového čísla zubu od střední čary v kombinaci s úhlovým znakem. Pro zuby dočasné používáme římské číslice.

Pro snadnější počítačové zpracování se užívá dvojčíselný systém podle mezinárodní dohody Fédération Dentaire Internationale (Čihák 2002). V tomto systému je každému kvadrantu přiřazeno číslo. Jedničkou je označen pravý horní kvadrant a dál jsou kvadranty značeny po směru hodinových ručiček. Označení zubu poté obsahuje nejprve označení kvadrantu a poté pořadové číslo zubu od střední čary (tzv. Palmerův systém). Podle tohoto systému je např. první premolár vpravo nahoře označen číslem 14 a druhý premolár vpravo dole číslem 35. U dočasné dentice jsou kvadranty číslovány stejně, ale od čísla 4 do čísla 8 a pořadí zubu se zapisuje v arabských číslicích. (Čihák 2002)

## 2.2 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA ZUBU

Na podélném řezu každým zubem můžeme rozlišit několik částí. (Wolf 1940)

### 2.2.1 KORUNKA ZUBU

První je **korunka zubu (corona dentis)**. Je to část zubu, která vyčnívá z dásně do dutiny ústní, je pokryta sklovinou (enamelum) a jedná se o vlastní funkčně tvarovanou část. Na korunce je možné rozlišit několik ploch (facies), které se liší tvarem a polohou na zubu. Kousací plocha (facies oclusialis) je různě tvarovaná a podle typu zubu má jiný počet hrbolků (cuspidales dentales). Podle počtu hrbolků rozlišujeme zuby bez hrbolků, zuby s jedním hrbolkem nebo zuby s více hrbolky. Plochy směřující do vestibulum oris jsou facies vestibularis a podle umístění zubu je dělíme na facies labialis (proti rtům) a facies buccalis (proti tvářím). Plochy směřující do cavitas oris jsou označovány jako facies oralis a jsou rozdělovány na facies palatinalis (pro zuby horní čelisti) a facies lingualis (pro zuby dolní čelisti). Styčné plochy mezi sousedními zuby se nazývají facies contactus. Plochy směřující dopředu k vrcholu zubního oblouku jsou tzv. facies mesiales a plochy směřující naopak dozadu od střední čáry jsou facies distales. (Čihák 2002, Mazurová 2004)

### 2.2.2 KRČEK ZUBU

Druhou částí je **krček zubu (collum dentis)**. Jedná se o úsek zubu, který odděluje korunku a kořen. Krček je kryt měkkými tkáněmi a zdravá dásněň k němu pevně přiléhá. Mez epitelem dásně a zubem je vytvořen tzv. gingivodentální uzávěr, který funguje jako ochrana proti vniknutí cizorodých látek a bakterií z dutiny ústní do pojiva kolem zubního kořene. (Čihák 2002, Mazurová 2004)

### 2.2.3 KOŘEN ZUBU

Další část představuje **kořen zubu (radix dentis)**. Je to část zubu, která je uložena v kostěném lůžku čelisti (alveolu, alveolus dentes) a s čelisti je spojena systémem pojiva, zvaným ozubice (periodontium). Kořen může být jednoduchý nebo rozdělený ve více větví

(rami radialis dentis). Podle počtu větví dělíme zuby na jednokořenné, dvoukořenné a tříkořenné. Každý kořen je vždy zakončen hrotem (apex radialis dentis).

Počtu kořenů jsou přizpůsobeny i alveoly. U jednokořenových zubů jsou alveoly jednoduché, ale u vícekořenových zubů jsou alveoly rozděleny přepážkami (septa interradicularia) tak, že každý kořen je v odděleném prostoru. Mezi sousedními alveoly se také nacházejí přepážky (septa interalveolaria). Velikost a hloubka jednotlivých alveolů závisí na existenci a délce kořenů. S růstem kořenů se alveoly prohlubují a při ztrátě zubu naopak atrofují a po určité době mizí docela. (Čihák 2002, Mazurová 2004)

## 2.2.4 DŘEŇOVÁ DUTINA

Uvnitř každého zubu se nalézá **dřeňová dutina (cavitas dentis)**. V oblasti korunky je rozšířena a vybíhá ve výběžky (cornua pulpa). Přes krček se potom zužuje do kořenového kanálku (canalis radialis dentis). Kořenový kanálek prochází kořenem až na jeho hrot, kde ústí jako foramen apicis dentis. V některých případech mohou z kořenového kanálku odstupovat ještě i další přídavné kanálky, které mohou posléze samostatně ústít na povrch kořene. Díky těmto kanálkům může do dřeňové dutiny snadněji a rychleji pronikat infekce z periodontia. Vlivem ukládání sekundárního dentinu dochází s věkem k postupnému zužování kanálku. V případě, že by došlo k úplnému uzavření kanálku, následovala by zástava krevního oběhu, nekrosa příslušných tkání a nakonec odumření zubu. Dřeňová dutina obsahuje pojivovou tkáň s cévami a nervy, která je označovaná jako zubní dřeň. (Čihák 2002, Mazurová 2004)

## 2.2.5 ZUBNÍ DŘEŇ

**Zubní dřeň (pulpa dentis)** je tvořena řídkým kolagenním vazivem, které kromě fibroblastů, kolagenních vláken a základní amorfni hmoty obsahuje také cévní a nervové pleteně zubu.

V zubní dřeni můžeme nalézt kromě fibroblastů také další typy buněk. Patří sem také odontoblasty a buňky bloudivé. Matrix zubní dřene je tvořena amorfni hmotou a retikulárními a kolagenními vlákny. S postupujícím věkem v dřeni přibývá kolagenních

vláken na úkor amorfni hmoty a dřeň se tak stává hustší.

Zubni dřeň lze rozdělit na dvě části a to na vrstvu vnější a vnitřní. Vnější vrstvu je možno ještě dále rozdělit na část obsahující fibroblasty a část označovanou jako Weilova zóna (stratum subodontoblasticum). Vnitřní vrstva je část obsahující retikulární a kolagenní vlákna a množství buněk. Jsou to například hvězdicovité fibroblasty a bloudivé buňky (histiocyty, lymfocyty, plasmatické buňky a nediferencované buňky).

Do dřeňové dutiny vstupují kořenovým kanálkem 2 - 3 tepny, které se dále rozpadají v kapilární pleteň. Z této sítě se krev shromažďuje do venózního řečiště. Nervy jsou v dřeni obsaženy jako tzv. plexus Raschkowi, který vysílá vlákna až mezi vrstvu odontoblastů, vystylajících dřeňovou dutinu. Aferentní nervová zakončení jsou citlivá hlavně na bolest. Při vzniku zubního kazu dochází k obnažení dentinu a díky bohaté inervaci je kaz velmi bolestivý. Při porušení skloviny v oblasti krčku dochází ke zvýšené citlivosti na teplo a na chlad. (Konrádová 2000, Dylevský 2000, Čihák 2002, Mazurová 2004)

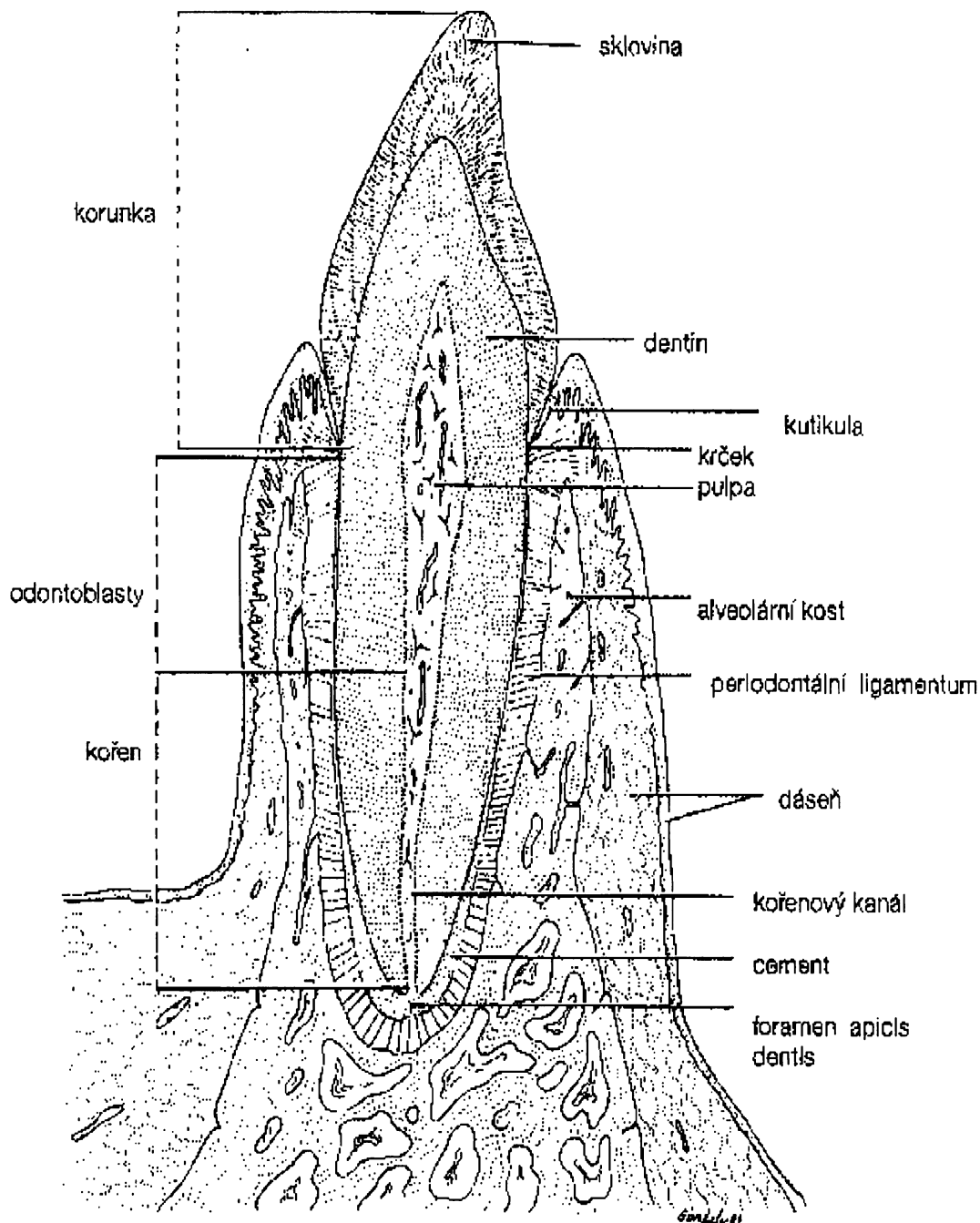
## 2.3 GINGIVA

Sliznice dásně kryje zevní povrch alveolů. Je složena z tuhého vláknitého vaziva s nízkým obsahem elastických vláken a pevně srůstá s periostem čelisti. Na povrchu přivráceném do úst je kryta epitelem, který je vlastní dutině ústní (nerohovějící vrstevnatý dlaždicovitý). Tento epitel částečně kryje i oblast dásně přivrácenou k zubu. Pod gingivodentální hranicí bývá sliznice bohatě infiltrována lymfocyty a plasmatickými buňkami.

Sklovina nebo cement je spojena s epitelem dásně pomocí tzv. gingivodentálního uzávěru. Epitel dásně je spojen se sklovinou pomocí kutikuly, která je podobná bazální lamině a tvoří tzv. Gottliebův epitelový úpon. Okolo celé korunky je mezi sklovinou a epitelem vytvořen mělký žlábek, který označujeme jako gingivální žlábek. Hlavní funkcí celého gingivodentálního uzávěru je zabránit průniku nežádoucích látek (sliny, č. potravy infekce) do periodontia. Jakékoli porušení této uzávěry může vést k poškození dásně nebo jejímu odumření, stejně tak jako periodontia a v extrémním případě může vést až k vypadnutí zubu. Častým jevem je tzv. gingivální recese neboli postupný sestup epitelové

manžety a následné obnažení krčku zubu. (Wolf 1940, Mazurová 2004)

Obr. 1 Diagram sagitálního řezu řezákem zasazeným v kosti dolní čelisti (Převzato z Junqueira 1997)



## **2.4 JEDNOTLIVÉ ZUBY STÁLÉHO CHRUPU - POPIS A ROZLIŠENÍ**

### **2.4.1 DENTES INCISIVI - ŘEZÁKY**

Řezáky mají lehce labiálně vykloněnou korunku a na vrcholu zubu se nachází kousací hrana. V oblasti kousací hrany je sklovina tenčí než v jiných částech korunky a proto u opotřebovaných zubů zde prosvítá dentin jako hnědý proužek.

Orální plocha korunky řezáku je mírně konkávní a v blízkosti krčku se vytváří nepárový hrbolek tzv. tuberculum dentis. Po stranách korunky probíhají zesílení sklovinné lišty směrem k tuberculum dentis. Největší je první horní řezák, druhý je mu tvarově podobný, ale je menší. Oba dolní řezáky jsou štíhlejší a jejich tvar připomíná dlátka. Řezáků je celkem 8, přičemž v každé čelisti se nachází 4. (Dylevský 2000, Čihák 2002)

### **2.4.2 DENTES CANINI - ŠPIČÁKY**

Špičáky jsou obvykle velké zuby s dlouhými kořeny, které mají kousací hranu rozdělenou ve 2 části. Kousací hrana je rozdělena hrotem a to tak, že šikmý okraj hrotu korunky svažující se od hrotu je strmější na distální straně než na mesiální. Jedná se o jednokořenné zuby, jejichž kořen je mírně stočen distálně. Korunka horního špičáku jde ve směru osy kořene, zatímco korunka dolního špičáku je zakloněna lehce lingválně. V každé čelisti se nachází 2 špičáky. (Dylevský 2000, Čihák 2002)

### **2.4.3 DENTES PREMOLARES - TŘENOVÉ ZUBY**

Třenové zuby mají 2 hrbolky. Jeden hrbolek je vždy umístěn bukálně a druhý orálně. U horních zubů bývají hrbolky stejně velké nebo je trochu menší palatinální hrbolek. U dolních zubů je lingvální hrbolek výrazně menší. Kořen je většinou pouze jeden, ale u prvního horního třenového zubu bývá rozdvojen. U všech třenových zubů se může stát, že budou mít jeden kořen, v kterém se nachází dvojitý kanálek. V každé čelisti se nachází 4 premoláry. (Dylevský 2000, Čihák 2002)

#### **2.4.4 DENTES MOLARES - STOLIČKY**

Stoličky jsou vícehrbolkové a vícekořenové zuby. Tvar korunky horních stoliček je obrysem podobný kosočtverci a zářez mezi hrbolky svým tvarem připomíná písmeno H nebo K. Mají 3 kořeny, z nichž dva jsou orientovány bukálně a jeden palatinálně. Korunky dolních stoliček mají obrys čtvercový nebo obdélníkový a zářezy mezi hrbolky vytvářejí kříž. Dolní stoličky mají 2 kořeny, z nichž jeden je umístěn mesiálně a druhý distálně. Velikost stoliček klesá distálním směrem, přičemž první dolní stolička má 5 hrbolků. Druhá stolička je menší a více variabilní. Třetí stolička je nejvíce variabilní co do tvaru, velikosti a výskytu. Často se vyskytuje jen jako jednoduchý konus. (Dylevský 2000, Čihák 2002)

#### **2.5 DOČASNÝ CHRUP**

Dočasný chrup (*dentes decidui*) je tvořen drobnějšími zuby než chrup trvalý. Mají bílou barvu a jejich sklovina je průsvitná. Dřeňová dutina je relativně větší, ale tvarem se podobají stejnojmenným zubům stálého chrupu. Mají nižší korunky a více divergující kořeny stoliček, protože mezi kořeny již jsou uloženy základy příštích zubů stálého chrupu. (Čihák 2002)



## 2.6 STAVBA ZUBU

Kromě zubní dřene je zub tvořen ještě 3 typy tvrdé tkáně. Jsou to zubovina, sklovina a cement.

### 2.6.1 DENTIN (ZUBOVINA, SUBSTANTIA EBURNEA)

Dentin je zvápenatělá tkáň podobná kosti. Díky vyššímu obsahu solí je tvrdší než kost, ale je měkčí než sklovina. Od kosti se liší zejména tím, že buňky dentinu nejsou vloženy do dentinové tkáně. Dentin obsahuje asi 80% anorganických látek.

Dentin se skládá z buněk a dentinové matrix, která je produktem těchto buněk. Dentinová matrix je složena z kolagenních fibril (I. typu), které tvoří její vláknitou složku. Kolagenní fibrila jsou uspořádány do svazků o tloušťce 2 - 4  $\mu\text{m}$  a jsou spojeny tmelovou substancí (amorfní složka extracelulární matrix). Tyto svazky probíhají víceméně paralelně s povrchem zubu (při jeho tvorbě) a kolmo na dentinové kanálky.

V amorfní složce jsou proteoglykany obsahující chondroitinsulfát a keratansulfát. Mezibuněčná hmota dále obsahuje soli kalcia (asi 70% suché hmotnosti). Soli kalcia jsou hlavně ve formě hydroxyapatitu. Jeho destičkovité krystaly jsou menší než krystaly skloviny. (Junqueira 1999, Dylevský 2000, Wolf 1940)

Dentinovou matrix můžeme rozdělit na 3 typy. Je to tzv. intertubulární dentinová matrix, peritubulární dentinová matrix a krycí dentinová matrix.

Intertubulární dentinová matrix se nachází v korunce i kořeni. Její hlavní složkou jsou jemná kolagenní vlákna každé o průměru kolem 100 nm, která jsou rozptýlená v základní hmotě. Osnova vláken bez matrix se liší svou složitostí. Většina je tvořena náhodným plst' připomínajícím vzorem, který je svou plochou paralelní se vznikajícím povrchem predentinu. V oblastech, kde je umístěno více tubulů je vzor méně náhodný a vlákna se spojují ve svazky. Kromě toho několik vláken probíhá kolmo na tuto rovinu, souběžně s dentinovými tubuly.

Krycí dentinová matrix obsahuje více hrubších kolagenních vláken než intertubulární matrix. Tyto hrubší vlákna bývají označována jako tzv. von Korffova vlákna, ale použití tohoto termínu může být matoucí. V okluzní oblasti korunky jsou vlákna svou podélnou osou rovnoběžná s dentinovými tubuly. V postraních oblastech korunky a

v kořeni jsou vlákna umístěna více šikmo k apikální části zubu a v některých oblastech mohou probíhat paralelně s hranicí mezi dentinem a sklovinou.

Peritubulární dentinová matrix je tvořena hlavně základní hmotou s nízkým počtem kolagenních vláken. Tato matrix lemuje dentinové tubuly. Přestože je secernována před počátkem mineralizace nevyskytuje se na povrchu predentinu. Tloušťka vrstvy peritubulární matrix probíhající podél tubulů není ve všech částech tubulů stejná, ale mění se. Přejít mezi intertubulárním a peritubulárním dentinovou matrix je vždy strmý. (Hillson 1996)

Obr. 2 Peritubulární dentin.(Hillson 1996)



Lumen tubulů je zobrazen černě, vysoce mineralizovaný peritubulární dentin je patrný jako bílé oblasti, intertubulární dentin je šedý

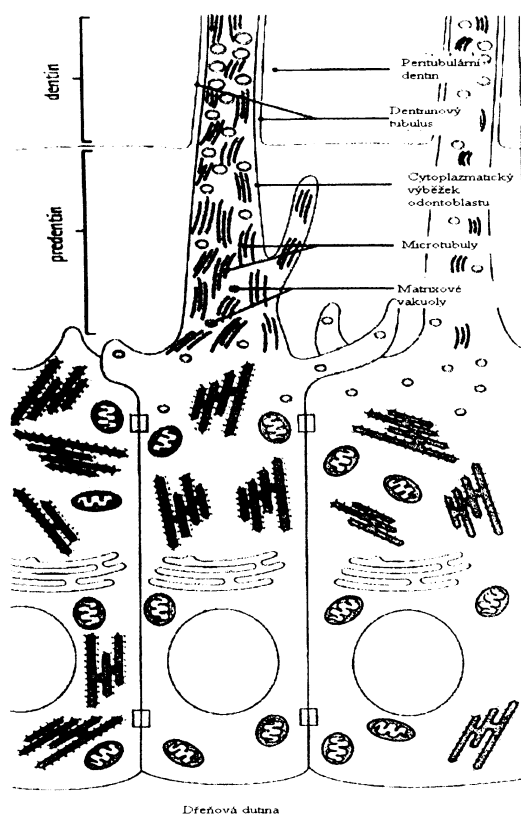
Buňky produkující organickou matrix dentinu jsou odontoblasty. Lemují vnitřní povrch zubu a oddělují jej od cavum pulpae. Jsou to polarizované buňky, které produkují organickou základní hmotu pouze na povrchu přivráceném k dentinu a tak oddělují dentin od zubní pulpy. Buněčná jádra jsou oválná a umístěna při bázi buněk. Odontoblasty mají zřetelné mitochondrie a retikulární aparát je umístěn v centrální části buňky. Buněčná báze je buď zakulacena nebo z ní vychází krátký výběžek. Jedná se o krátké bazální výběžky, které jsou umístěny směrem do dřeňové dutiny. Zde spolu s výběžky buněk pulpy a vlákny

vaziva vytváří nebuněčnou vrstvu, kterou označujeme jako Weilovu zónu. Odontoblasty secernují proteiny se sekrečními granuly obsahujícími protokolagen. Těla buněk jsou spolu navzájem mechanicky propojena pomocí desmosomů.

Nemineralizovaná matrix odontoblastů se nazývá predentin a nachází se v tenké vrstvě na hranici dentinu a dřevové dutiny. Mineralizace dentinu začíná vznikem váčků ohraničených membránou – matrixových vesikul. Tyto obsahují jemné krystalky hydroxyapatitu, které slouží jako krystalizační jádra. Na základě těchto jader se ukládá další minerál na okolní kolagenní fibrila.

Odontoblasty vysílají tenké větvené cytoplazmatické výběžky, které probíhají směrem k povrchu dentinu. Jejich funkcí je zajištění látkové výměny v dentinu. Obsahují elementy cytoskeletu, zejména mikrofilamenta a mikrotubuly. S postupným růstem dentinu se vlákna prodlužují a jsou uloženy v tenkých kanálcích – dentinové kanálky (canaliculi dentis, tubuli dentinales). (Junqueira 1999, Dylevský 2000, Wolf 1940, Konrádová 2000, Stevens 2005)

Obr. 3 Stavba odontoblastů (Stevens 2005)

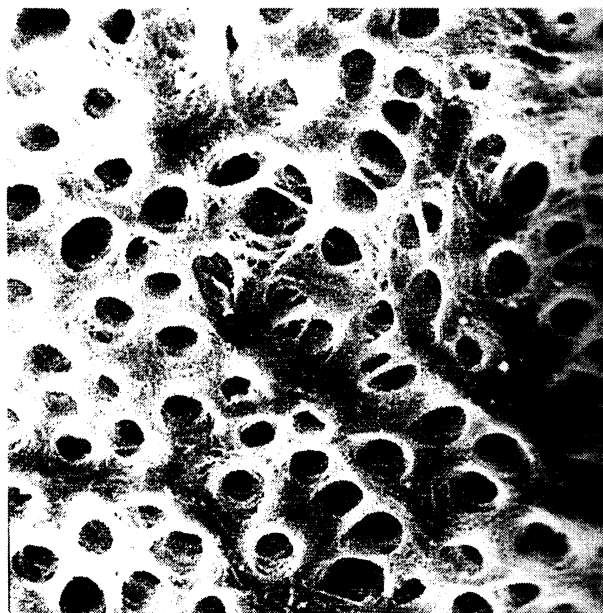


Vlákna mají průměr 3-4  $\mu\text{m}$  poblíž těla buňky a směrem k distálním koncům se ztenčují. Prostor mezi cytoplasmatickými výběžky a stěnami kanálků je vyplněn glykosaminoglykany.

Tyto radiální kanálky procházejí celou hmotou dentinu a na rozhraní dentinu a skloviny se bohatě větví. Mají esovitý průběh a první konvexita jde směrem ke kořenu a druhá konvexita směrem ke korunce. Kromě toho kanálky probíhají spirálovitě ve vlákách. Tyto vlnky jsou pravidelné a na výbrusech zubu jsou na dentinu patrné pravidelné pruhy rovnoběžné s povrchem, Schregerovy čáry.

Hlavní kanálky jsou mezi sebou spojeny drobnějšími kanálky spojovacími, které mohou spojovat i kanálky značně vzdálené. Zakončení kanálku se liší podle jeho umístění. V kořenu a krčku se kanálky větví dichotomicky, pak keřovitě a končí slepě nebo arkádovitě spojenými konci v Tomesově vrstvě. V korunce je hranice mezi dentinem a sklovinou nerovná a povrch dentinu jeví jamkovitě vyhlodaný povrch, do kterého zasahuje sklovina.

Obr. 4 Dentinové tubuly (Stevens 2005)



Dentinové kanálky jsou vystlány substancí, která silně láme světlo a barví se jinak než dentin. Jedná se o tzv. Neumannovu pochvu. Pochva přechází na vnitřní povrch dentinu, kde je perforovaná otvůrkami kanálků. Zvápenatělá hmota dentinu neprostupuje

přímo tubuly, ale vyplňuje prostory mezi nimi. Čerstvý dentin je nažloutlý a polotransparentní. V suchém stavu má hedvábně lesklý vzhled, protože do kanálek se dostává vzduch. (Junqueira 1999, Dylevský 2000, Wolf 1940, Konrádová 2000, Stevens 2005)

V blízkosti hranice se sklovinou i s cementem se nacházejí malé okrsky nezápenatělého dentinu. Na výbrusech se jeví jako dutinky. Na hranici dentinu a cementu tvoří nezápenatělý dentin souvislou vrstvičku, kterou nazýváme zrnitá vrstva Tomesova. V oblasti korunky jsou tyto dutinky větší a nazývají se Czermakovy lakuny nebo interglobulární okrsky. (Wolf 1940)

Dentin je inervován pomocí nemyelizovaných nervových vláken. Tato vlákna procházejí mezi odontoblasty oblastí predentinu. Do oblasti vlastního dentinu pronikají jen na malou vzdálenost a spolu s cytoplasmatickými výběžky odontoblastů vstupují do dentinových tubulů. Uvnitř tubulů se přikládají k výběžkům a spojují se s nimi. Celý systém je obdobou jednoduchých senzitivních zakončení. Tyto nervová zakončení způsobují citlivost v této oblasti na mechanické, chemické, tepelné a elektrické dráždění. (Mazurová 2004)

Jakmile jsou odontoblasty jednou diferencovány již se dále nedělí a zůstávají zachovány po celou existenci zubu (pokud nedojde např. k jejich zničení infekcí. Na rozdíl od kosti zůstává dentin jako mineralizovaná tkáň funkční i po zničení odontoblastů a pulpy vlivem infekce. (Konrádová 2000, Wolf 1940, Hillson 1996)

Pokud dojde u dospělých zubů k narušení skloviny následuje většinou reaktivní dentinogeneze, při které se obnoví syntéza komponent dentinu. (Junqueira 1999, Dylevský 2000, Wolf 1940, Konrádová 2000)

### Sekundární dentin

S postupujícím věkem a vlivem abraze dochází k tvorbě tzv. sekundárního dentinu. Po ukončení tvorby zubu pokračuje tvorba dentinu pomalou tvorbou sekundárního dentinu. Tento dentin se tvoří podél stěn dřeňové dutiny v tubulech, které navazují na tubuly primárního dentinu. Hranice mezi primárním a sekundárním dentinem je jen málo znatelná. Největší rozdíl mezi oběma dentiny je vidět při použití polarizační mikroskopie. Hranice je nejostřejší po stranách a na stropě dřeňové dutiny. Naopak mnohem hůře je rozpoznatelný

sekundární dentin v kořenovém kanálku.

### Terciární dentin

Tento dentin většinou zabírá větší objem dřeňové dutiny a kořenového kanálku než sekundární dentin. Většinou není součástí žádných tubulů a pokud ano, tak se jedná o nepravé tubuly, které nejsou spojeny s tubuly primárního nebo sekundárního dentinu. Depozice tohoto dentinu je odpovědí v okamžiku, kdy dojde k odhalení primárního dentinu vlivem poškození skloviny nebo cementu. Odontoblasty, které se nacházeli v exponovaných tubulech umírají. Zůstávají po nich mrtvé úseky, které jsou do oblasti pulpy uzavřeny pomocí záplat z dentinu. Od primárního dentinu jsou potom odděleny tenkou vrstvou sklerotické oblasti. (Hillson 1996)

## 2.6.2 ENAMELUM (SKLOVINA)

Sklovina je nejtvrďší tkáň v lidském těle a současně tkáň nejbohatší na kalcium. Má modravě bílou barvu a je transparentní v tenkých příčných destičkách. Je z 95% tvořena solemi kalcia, hlavně hydroxyapatitem, 0,5% tvoří organická hmota a zbytek představuje voda. Tvrdostí se podobá apatitu nebo křemenu. Sklovina jako jediná část zubu vzniká z buněk ektodermového původu. Ostatní struktury jsou odvozeny z mezodermu a buněk neurální lišty.

Organická matrix skloviny vzniká činností ameloblastů. Jsou to vysoké cylindrické buňky, které mají jádro uloženo při bázi buňky. Na apikální straně buňky jsou výběžky označované jako Tomesovy výběžky, které obsahují četná sekreční granula. Granula obsahují protein tvořící matrix skloviny. V oblasti pod jádrem se nachází velké množství mitochondrií. V oblasti nad jádrem je mohutně rozvinuté drsné endoplasmatické retikulum a Golgiho komplex. Na apikálním i bazálním konci jsou sousední ameloblasty spojeny pomocí zonulae occludentes. (Junqueira 2000, Konrádová 2000, Wolf 1940)

Ameloblasty před svým sekrečním produktem „ustupují“ směrem k povrchu zubu. Když je tvorba skloviny ukončena jsou ameloblasty uloženy na jejím povrchu a jsou odstraněny při prořezání zubu. (Konrádová 2000)

Na rozdíl od dentinu není organická matrix skloviny složena z kolagenních fibril.

Obsahuje minimálně 2 heterogenní skupiny proteinů – amelogeniny a enameliny.

Sklovina je tvořena krystaly hydroxyapatitu, které mají tvar protáhlých tyčinek nebo nepravidelných hranolů. Označujeme je jako sklovinná prizmata. Prizmata procházejí celou vrstvou skloviny a mají poměrně složitý průběh, který zřejmě odpovídá funkčnímu zatížení zubu při kousání a žvýkání. Obecně lze říct, že prizmata odstupují v cirkulárních pruzích kolmo od dentinu. Ve středních oblastech skloviny probíhají spirálovitě a v povrchové vrstvě zase kolmo k povrchu. Kromě toho se ve sklovině vyskytuje řada malých vlánek a vláknů sousedních zón se často kříží. Průměrně měří 5-10 nm a k povrchu skloviny se rozšiřují. Prizmata do sebe vzájemně zapadají a jsou spojeny interprizmatickým emailem (substancí). Interprizmatický email je také tvořen krystalky hydroxyapatitu a od sklovinných prizmat se liší orientací krystalů. (Junqueira 2000, Konrádová 2000, Wolf 1940)

Na příčných výbrusech korunky lze pozorovat hnědavé (v dopadajícím světle bělavé) koncentrické, s povrchem rovnoběžné linie, které označujeme jako Retziusovy čáry. Jejich vznik je podmíněn nestejným, vrstevnatým zvápenatěním prizmat skloviny. V oblastech, kde je méně vápníku je více nezvápenatělých oblastí, které se při vysušení smrští a na jejich místo vstupuje vzduch způsobující hnědavé zbarvení.

Povrch skloviny kryje kutikula zubu, Nasmythova blanka. Nelze ji seškrábnout, ale po odvápnění a rozpuštění skloviny v kyselině se uvolní a zůstane přichycena na cementosklovinnou hranici krčku. Kutikula chybí na skusné ploše a jejím okolí. (Wolf 1940)

### **2.6.3 CEMENTUM (CEMENT)**

Tato tkáň se nachází na povrchu dentinu v oblasti kořene a krčku. Cement je v podstatě modifikovaná vláknitá kost chudá na buňky bez Haversova systému a krevních cév, která je s povrchem dentinu spojena kolagenními vlákny. Na krčku je vrstva cementu tenká (20 - 30  $\mu\text{m}$ ), zatímco na kořeni vrstva dosahuje tloušťky 1 mm a na apexu kořene až 2 mm.

Cement se tvoří ve 2 formách. První je acelulární (primární) cement, v němž jsou uloženy cementotvorné buňky, cementocyty. Cementocyty jsou nejprve uloženy na

povrchu cementu. Druhou formou cementu je celulární (sekundární) cement, který se skládá z lamel podobně jako kost, ale neobsahuje Haversův systém a jsou v něm uloženy cementocyty. Uvnitř sekundárního cementu cementocyty vytvářejí matrix s kolagenními vlákny a jejich výběžky jsou uloženy v kanálcích cementu. Postupným růstem cementu jsou do něj zavzata vlákna periodontia jako tzv. Sharpeyova vlákna. Přírůstky cementu je možné sledovat pomocí mikroskopu a jsou označovány jako Salterovy inkrementální linie. Cement se tvoří až při erupci zubu a současně se upevňuje na kořen. To je důvod proč je primární cement umístěn v oblasti krčku a sekundární cement je na kořeni, kde jeho tloušťka roste směrem k apexu kořene.

Cement stejně jako kostní tkáň reaguje na mechanickou zátěž resorpcí nebo novotvorbou tkáně. Dojde-li ke zničení periodontu, cement podléhá nekróze může být vstřebán. Stálá tvorba cementu umožňuje kompenzaci růstových změn, kterými prochází zub a udržení kontaktu mezi kořeny a stěnami alveolu. (Junqueira 1999, Čihák 2002)

#### **2.6.4 UPEVNĚNÍ ZUBŮ V ALVEOLU (PERIODONT)**

Zuby jsou v čelistech upevněny pomocí vazivového aparátu - gomphosis. Prostor mezi cementem a stěnou alveolu se označuje jako periodontální štěrbina a je vyplněn řídkým vazivem. Nacházejí se tu systémy vazivových vláken, tzv. závěsný zubní aparát. Aparát je tvořen několika systémy, které se liší směrem a funkcí. (Čihák 2002, Dylevský 2000)

Vlákna apikální - jdou od hrotu kořene ke dnu alveolu a zabraňují kývání hrotu nebo vystupování zubu z alveolu.

Vlákna gingivální (ligamentum circulare) - jdou radiálně od krčku zubu do vaziva dásně a drží dásně u krčku

Vlákna transseptální (ligamentum horizontale) - překračují septa mezi alveoly a vážou dohromady jednotlivé zuby tak, že obkružují jejich krčky a kolem sousedících zubů tvoří vazivové "osmičky". Díky tomuto spojení tvoří všechny zuby jedné čelisti funkční celek. Pokud dojde k poškození tohoto systému (např. extrakcí zubu), pak je narušen celý zubní oblouk a zuby se posunou do vzniklé mezery.

Vlákna alveolární - jdou od stěny alveolu k cementu zubu. Jsou rozlišeny na tři systémy



(vlákna alveolárního hřebene, vlákna šikmá, vlákna horizontální).

Závěsné vazy nejsou jediná složka periodontální štěrbiny. Nachází se zde také množství fibroblastů a hlavně buňky, které jsou součástí monocytomakrofágového systému, tedy imunitního systému. Závěsný aparát umožňuje minimální pohyb zubů a tím zabraňuje přímému přenosu tlaku na kost a tím její resorpci. Navíc uspořádání vláken podporuje síly vznikající při žvýkání. Kolagen periodontálních vazů vykazuje rychlou obměnu proteinů. Tento jev má dva funkční důsledky. Nedostatek vitamínu C a bílkovin vede k atrofii vazů a ztrátě zubů. Na druhou stranu plastická struktura vazů umožňuje ortodontické intervence, které umožňují změnit postavení zubů. (Čihák 2002, Dylevský 2000)

### **2.6.5 ALVEOLUS (ZUBNÍ LŮŽKO)**

Kosti alveolárních výběžků jsou stále v kontaktu s periodontálními vazy. Vnitřní plocha alveolu je lemována ploténkou kosti. Do této ploténky se upínají periodontální vazy. Alveolární kost je schopna se poměrně snadno remodelovat. Tento jev je hojně využíván v ortodoncii, kde lékařům umožňuje do jisté míry měnit polohu jednotlivých zubů v alveolární kosti. (Mazurová 2004)

## **2.7 VÝVOJ ZUBŮ (ODONTOGENEZE)**

Vývoj zubů je proces, který začíná v 5. – 6. embryonálním týdnu a je ukončen v období po 18. roce života. Geneticky se zuby skládají z tkání orálního epitelu (ektodermální původ) a mesenchymálního původu (mesoderm a buňky neurální lišty). Epiteliálního původu je jen sklovina. Ostatní zubní tkáně jsou původu mesenchymálního. Mesenchym neurální lišty vysílá do přilehlého ektodermu signály, které zahajují odontogenezi. Celá odontogeneze probíhá plynule, ale z popisných důvodů se rozděluje do několika stadií. Vývoj všech zubů neprobíhá najednou, ale první zuby se objevují v předním úseku mandibuly. Dál vývoj pokračuje v přední části maxily a v obou zadních částech. (Wolf 1940, Junqueira 1999, Moore 2002)

Vývoj zubu můžeme rozdělit do několika po sobě jdoucích stadií:

- Vznik dentogingivální lišty

- Vznik zubního pupenu
- Stadium zubní čepičky
- Orgán skloviny (tvorba odontoblastů a ameloblastů)
- Vývoj dentinu
- Tvorba skloviny
- Vznik periodontální membrány a tvorba cementu

### **2.7.1 VZNIK DENTOGINGIVÁLNÍ LIŠTY**

Ze začátku vývoje zárodku nemá dutina ústní rty. V 6. týdnu vrůstá epitel dutiny ústní do hloubi a tvoří tzv. gingivolabiální lištu, která se prohloubí a oddělí tak od sebe ret a gingivu. Krátce nato dochází v oblasti budoucí gingivy k proliferaci epitelu do hloubky a vzniká tzv. dentální lamina (zubní lišta). Lamina má tvar písmene U a sleduje zakřivení primitivních čelistí.

### **2.7.2 VZNIK ZUBNÍHO PUPENU**

Na 10 místech horní čelisti a na 10 místech dolní čelisti dochází k vrůstání dentální lišty a k tvorbě tzv. zubních pupenů. Těchto deset pupenů tvoří základ pro deciduální chrup. Deset pupenů v každé dentální lamině pro deset zubů deciduálního chrupu v každé čelisti. Pro zuby permanentního chrupu, které mají předchůdce v dočasné dentici, se pupeny tvoří od 10. týdne. Vytvoří se v hloubce dentální laminy a lingválně od pupenů pro zuby deciduální. Vzhledem k tomu, že moláry permanentní dentice nemají předchůdce v dočasné dentici vznikají jejich pupeny v zadních výběžcích zubních lišt. Většina pupenů permanentní dentice vzniká ve fetálním období. Pouze pupeny 2. a 3. permanentních molárů vznikají až postnatálně.

### **2.7.3 STADIUM ZUBNÍ ČEPIČKY**

Směrem proti růstu zubního pupenu se diferencuje mesenchymální dentální papila. Papila ze spodu vrůstá do proliferovaných oblastí dentální lišty a mění tvar pupenů na

čepičkovitý (později zvonovitý). Ektodermová část tohoto čepičkovitého útvaru se označuje jako sklovinný orgán a později dává vzniknout sklovině. Vnitřní část čepičkovitého útvaru, zubní papila, je základem budoucí zubní pulpy. Zubní papila spolu s orgánem skloviny tvoří tzv. zubní zárodek (Gartner 1997 in Moore 2002).

Sklovinný orgán rozdělujeme na dvě části. Buňky zevní vrstvy označujeme jako zevní sklovinný epitel a buňky vnitřní vrstvy jako vnitřní sklovinný epitel. Oblast mezi oběma listy sklovinného epitelu se nazývá sklovinné retikulum.

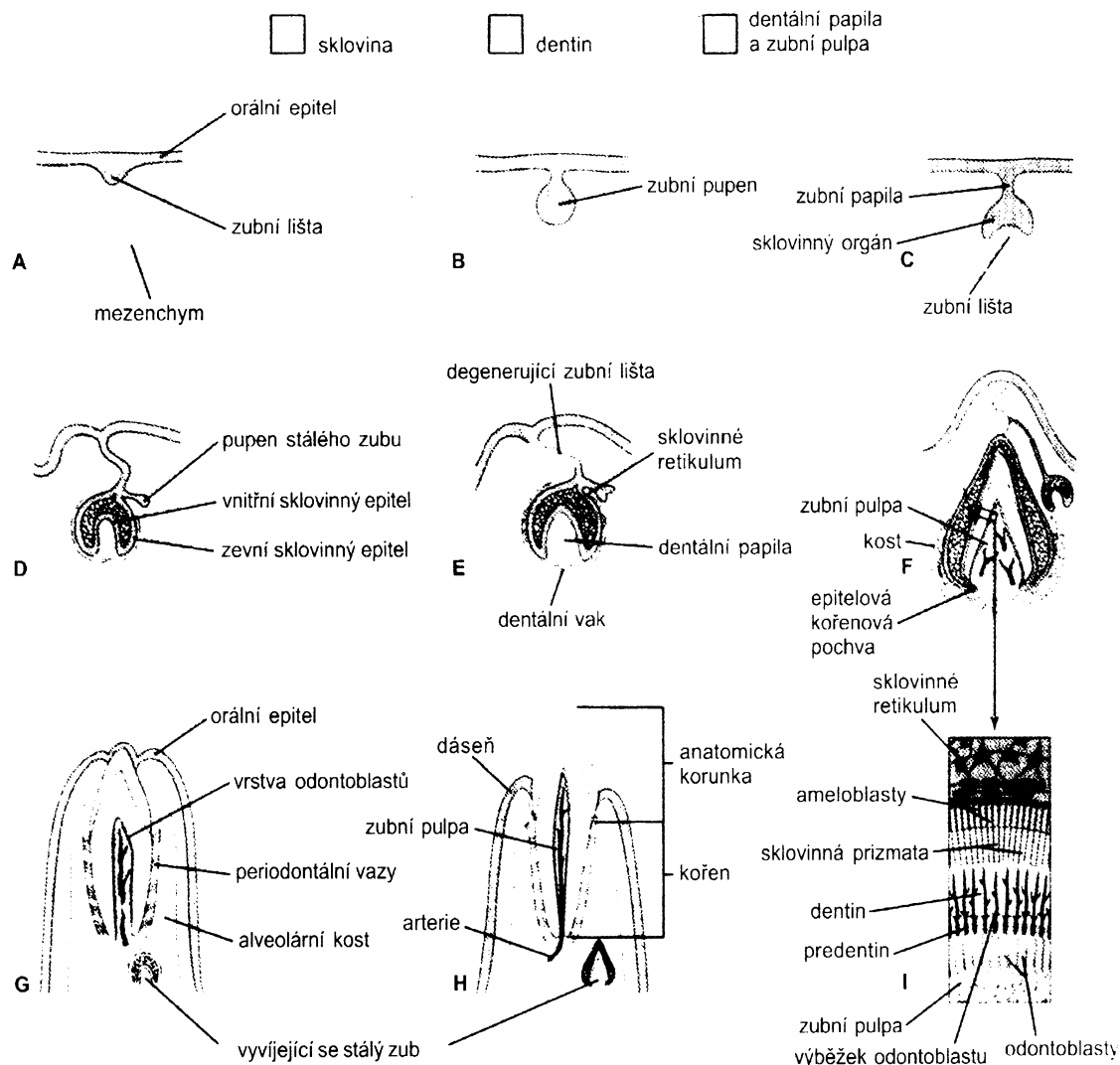
#### **2.7.4 ORGÁN SKLOVINY**

Na orgánu skloviny lze rozlišit dvě oblasti. První je oblast, která byla růstem papily vchlípena dovnitř pupenu a druhá je část, která vchlípena nebyla. Epitel sklovinného orgánu se mění v jednovrstevný dlaždicový epitel, jehož buňky označujeme jako ameloblasty. Podle polohy na vchlípené nebo nevchlípené části sklovinného orgánu dělíme ameloblasty na vnější a vnitřní. Vnější ameloblasty jsou kubické buňky, zatímco vnitřní ameloblasty jsou vysoké, štíhlé, cylindrické buňky produkující sklovinu.

Zubní lišta (lamina dentalis) se nad sklovinným orgánem rozděluje ve dvě lišty, které až na zbytky postupně vymizí. V místech, kde je dentální lišta spojena se sklovinným orgánem, se tvoří malý pupen jako základ budoucího stálého zubu.

Orgán skloviny společně s mesenchymální papilou jsou obklopeny mesenchymálním pouzdem (dentální vak), které je předchůdcem periodontální membrány. Do mesenchymální papily stále více pronikají cévy a kapiláry a její nej povrchovější vrstva buněk, naléhající na ameloblasty, tvoří odontoblasty. Tyto na sebe naléhající vrstvy tvoří mezi sebou korunku příštího zubu. Vrstva odontoblastů produkuje směrem ven dentin a vrstva vnitřních ameloblastů produkuje směrem dovnitř vrstvu skloviny. Nejprve dochází k vývoji dentinu a poté skloviny.

Obr. 5 Schématické nákresy vývoje řezáku – sagitální řez (Moore 2002)

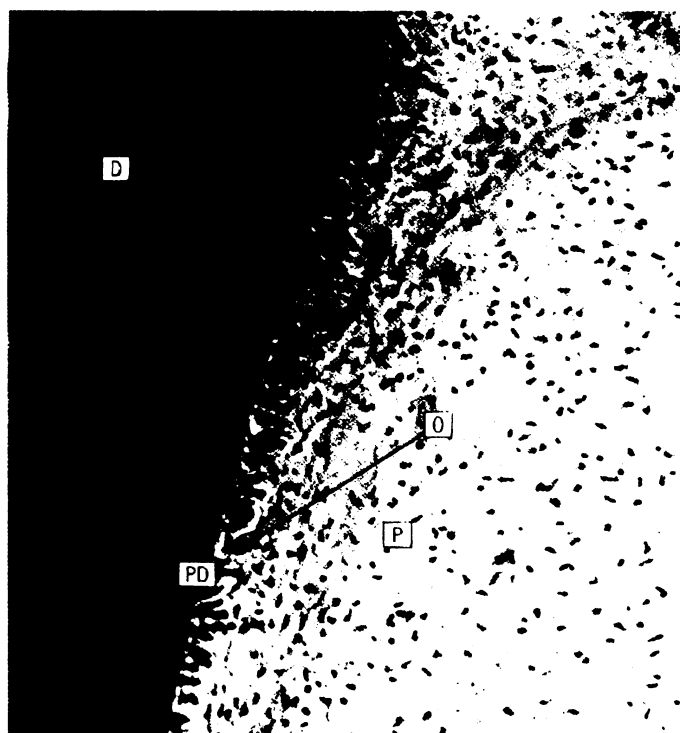


### 2.7.5 VÝVOJ DENTINU

Dentin se začíná tvořit od vrcholu papily. Dosud byly odontoblasty odděleny od ameloblastů pouze basální membránou. Jakmile se dentin začne tvořit, ukládá se mezi tuto membránu a vrstvu odontoblastů. Vrstva dentinu stále tloustne a směrem k periferii se rozrůstá. Dentinová vrstva se zprvu skládá pouze z retikulárních vláken a amorfni “tmelové substance”. V dalších vrstvách, které se stále přikládají jsou již retikulární vlákna nahrazena kolagenními. Při tvorbě dentinu odontoblasty vysílají radiálně Tomesova vlákna, která se ukládají v dentinových tubulech. Odontoblasty nejprve produkují nezávápenatělou hmotu

(pre dentin), který vždy jako nejmladší vrstva lemuje vnitřní povrch dentinu. V pre dentinu se poté na jeho vnější hranici tvoří vápenatíci, stále rostoucí vápenná centra, která směrem vně spolu splývají. Vrstva je poté v celé své tloušťce impregnována vápnem. Zvápenatění se stejně jako v kosti děje za přítomnosti fosfatázy, která se vyskytuje hlavně v pulpě a odontoblastech. Postupným tloušťnutím dentinové vrstvy se tvoří dentinový substrát korunky zubu.

Obr. 6 Fotografie vznikajícího dentinu (Stevens 2005)

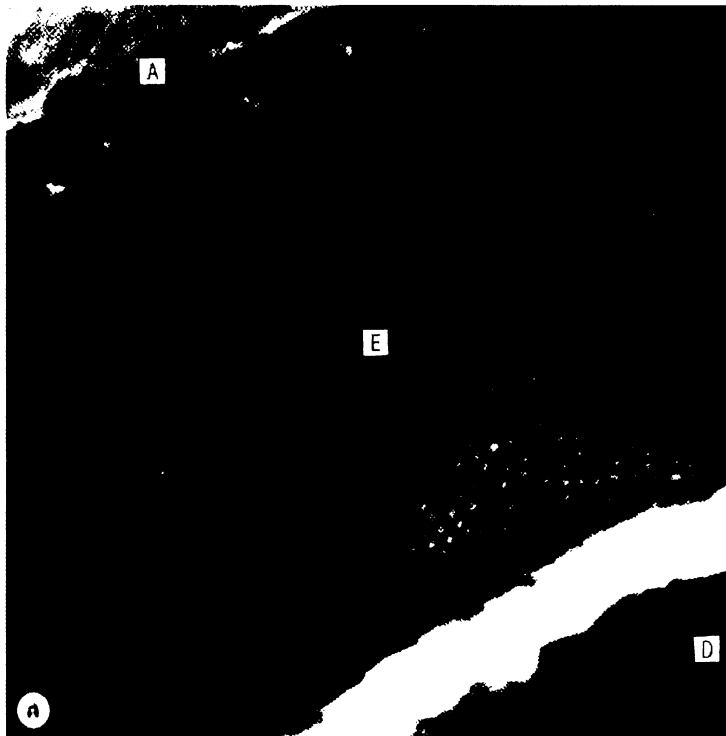


D – dentin, PD – pre dentin, O – odontoblasty, P – dřeňová dutina

## 2.7.6 TVORBA SKLOVINY

Krátce poté co se vytvoří první základ dentinu, začíná tvorba skloviny. Sklovina je tvořena ameloblasty na konci buněk, který je přivrácen k dentinu. V momentě, kdy ameloblasty začnou tvořit sklovinné hranoly, změní se jejich vzhled. V jejich cytoplasmě se začnou hromadit granula a homogenní materiál. Nejprve je tvořena nezvápenatělá hmota, tzv. substantia praeadamantia. Produkce a vápenatění se děje rytmicky. Dokladem vrstevnaté tvorby skloviny jsou Retziusovy linie.

Obr. 7 Fotografie vznikající skloviny produkované vrstvou ameloblastů (Stevens 2005)



E – sklovina, D – dentin, A - vrstava ameloblastů

### 2.7.7 TVORBA KOŘENE ZUBU

Přestože kořen není kryt sklovinou, podílejí se ameloblasty sklovinného orgánu na jeho tvorbě.

Účastní se pouze svým vlivem na odontoblasty, které začnou tvořit kořenový dentin. Odontoblasty staví kořenový dentin podle tvaru sklovinného orgánu, který se prodlužuje apikálním směrem. Původně zvonovitý sklovinný orgán se tak prodlužuje do tvaru trubice. Tato část sklovinného orgánu složená z vnitřních i vnějších ameloblastů se nazývá Hertwigova kořenová pochva. Vrstva dentinu takto stále roste do délky a šířky až se vytvoří celý kořen (nebo kořeny u vícekořenového zubu). Po ukončení tvorby dentinového kořene se Hertwigova kořenová pochva rozpadá a na její místo nastupují cementoblasty, které tvoří cementovou vrstvu kořene. (Wolf 1940, Moore 2002, Junqueira 1999)

## 2.7.8 PERIODONTÁLNÍ MEMBRÁNA A TVORBA CEMENTU

Periodontální membrána vzniká z dentálního vaku. Na jedné straně jako periost vystylá zubní alveolus a na straně druhé vrůstá svými vlákny do cementu. Tyto pevné kolagenní vazby se označují jako Sharpeyova vlákna. Cement je produkován cementoblasty jako tzv. acelulární a celulární cement. (Wolf 1940, Moore 2002, Junqueira 1999)

## 2.8 PROŘEZÁVÁNÍ ZUBŮ - ERUPCE

Při prořezání zubu musí vzniknout epiteliální uzávěr mezi sklovinou na krčku zubu a epitelem dásně. Toto opatření chrání vnitřní prostředí před pronikáním nečistot. Ještě před prořezáním, po dokončení tvorby korunky se zredukuje sklovinný orgán na tenkou vrstvu. Při prořezání zubu zůstane tato vrstva v kontaktu s epitelem gingivy. Na povrchu korunky při prořezání vymizí, ale zůstává na krčku zubu a tvoří spojení mezi gingivou a sklovinou.

Prořezání zubů je proces při kterém dochází k průniku zubu z čelisti a dásně a jeho růstu až do pracovní polohy. Korunka je hotová již před prořezáním zubu, zatímco kořen je ještě široce otevřen a stále roste do délky. Před prořezáním zubu dáseň zduří, objeví se bílý hrot zubu pod epitelem a následně epitel perforuje. Tkáně, které se nacházely nad korunkou, zanikají. Vývoj alveolu, cementu a periodontia po prořezání zubu ještě pokračuje. (Čihák 2002)

Erupce probíhá podle biologického kalendáře. Je jí dána doba i pořadí erupce jednotlivých zubů. Obecně platí, že k dřívější erupci dochází u zubů dolní čelisti a také dříve u dívek než u chlapců.

Dočasný chrup se prořezává zhruba od 6 měsíců a celá erupce by měla být ukončena do 2 let. Vývoj je časově variabilní a závislý na řadě činitelů, jako je pohlaví, výživa, civilizační a geografické faktory aj. Biologické kolísání této doby je asi 6 měsíců. Pokud dojde k opoždění růstu, jedná se o signál, že dochází k celkovému zpomalení vývoje dítěte. V případě, že nedojde vůbec k prořezání zubu nebo k jeho prořezání v atypické poloze, jedná se většinou o vývojovou vadu.

Trvalý chrup začíná prořezávat v 6. roce života a kromě 3. molárů bývá ukončen do 12. - 13. let. Jako první může prořezat první molár, tzv. molární typ prořezávání, nebo první řezák, tzv. frontální typ prořezávání. V současné době se stále častěji objevuje frontální typ

prořezávání. Tento trend se objevuje hlavně ve velkých městech a v rámci Evropy v západovýchodním směru. Jako poslední zub trvalého chrupu prořezává 3. molár, jehož erupce je časově velmi variabilní. Může prořezat po 2. moláru nebo až značně později, např. v dospělosti jako tzv. zub moudrosti. Relativně často dochází jen k částečné erupci třetího moláru nebo k ní nemusí dojít vůbec. Při prořezání třetí molár rotuje (horní dopředu a dolů, dolní dopředu a nahoru). Erupce třetího moláru souvisí s růstem corpus mandibulae do délky, protože v těle mandibuly musí pro molár vzniknout místo. Celý proces růstu a erupce zubů může negativně ovlivnit dlouhotrvající onemocnění v dětství. Proto je zubní věk důležitým ukazatelem při stanovení biologického věku dítěte. (Dylevský 2000, Čihák 2002)

Tab. 1 Věk prořezání dočasných zubů

Deciduální (dočasná) dentice	
<u>Horní čelist</u>	<u>Věk prořezání v měsících</u>
Mesiální řezáky	6. -8.
Laterální řezáky	9.
Špičáky	16. - 20.
Prvé moláry	12. - 16.
Druhé moláry	20. - 30.
<u>Dolní čelist</u>	
Mesiální řezáky	6.
Laterální řezáky	7.
Špičáky	16. - 20.
Prvé moláry	12. - 16.
Druhé moláry	20. - 30.

Věk prořezání zubů dočasné dentice (Perlíková 2006)



## 2.9 VÝMĚNA ZUBŮ

Řezáky, špičáky a premoláry stálého chrupu se zakládají linguálně a v hloubce pod zuby dočasného chrupu. Stoličky stálého chrupu se zakládají v prodloužení zubní lišty. Korunky stálých zubů se tvoří v době prořezávání dočasného chrupu a jejich kalcifikace postupuje od konce prvního roku života jedince. Do konce 5. roku dojde k ukončení kalcifikace hrotů korunek všech zubů kromě třetích molárů.

Jak zuby dočasného chrupu rostou vytváří tlak na zuby dočasné. Tento tlak trvá tak dlouho až zmizí kostěná přepážka mezi korunkou trvalého zubu a kořenem dočasného zubu. Na místě přepážky zůstává vazivo, v kterém se diferencují mnohojaderné osteoklasty. Osteoklasty postupně odbourávají kořen dočasného zubu. Nakonec zůstane v dásni jen široce otevřený kořen a následně uvolněný dočasný zub vypadává. Po jeho odstranění dojde k prořezání stálého zubu. (Čihák 2002)

Dočasné zuby jsou z čelistí uvolňovány v následujícím pořadí:

Tab. 2 Doba vypadávání dočasných zubů

Typ zubu	Doba vypadnutí
Mesiální řezák	6 – 7 let
Laterální řezák	7 - 8 let
Špičák	10 – 12 let
Prvý molár	9 – 11 let
Druhý molár	10 – 12 let

(Moore 2002)

Tab. 3 Věk prořezání trvalé dentice

Permanentní (trvalá) dentice	
<u>Horní čelist</u>	<u>Věk prořezání v letech</u>
Mesiální řezáky	7. – 8.
Laterální řezáky	8. – 9.
Špičáky	11. – 12.
Prvé premoláry	10. – 11.
Druhé premoláry	10. – 12.
Prvé moláry	5. – 6.
Druhé moláry	12. – 13.
Třetí moláry	17. – 21.
<u>Dolní čelist</u>	
Mesiální řezáky	6. – 7.
Laterální řezáky	7.- 8.
Špičáky	9. – 10.
První premoláry	10. – 12.
Druhé premoláry	11. – 12.
První moláry	5. – 6.
Druhé moláry	12. – 13.
Třetí moláry	17. – 21.

Věk prořezání zubů trvalé dentice (Perlíková 2006)

### **3. METODY ODHADU VĚKU**

Určení věku je jednou z nejdůležitějších charakteristik jak v archeologii, tak ve forenzní praxi. Umožňuje nám vytvořit si představu o životě minulých populací nebo identifikovat oběti násilných činů nebo hromadných neštěstí. Určení věku je vždy pouze odhadem biologického věku, nikoliv chronologického.

Existuje velké množství metod, podle kterých lze věk určovat. Zvláště jsou vypracovány metodiky pro určování věku u dětí a zvláště u dospělých. Dále lze metodiky dělit podle toho, jakou část těla jedince k určení věku používají. Jsou metody, které určují věk podle přirůstání epifýz, velikosti různých kostí, mineralizace chrupu, obliterace lebečních švů, změn symphysiální plochy os pubis, změny vnitřní struktury hlavice stehenní a pažní kosti, změny sternálního konce 4. žebra.

Zvláštní skupinou jsou metody histologické. Různí autoři používají k histologickému určení věku různé kosti, u kterých v přesně vymezených oblastech počítají množství osteonů. (Stout 1992 6. žebro klíční kost, Cool et al. 1995 okcipitální kost, Sýkorová 1996 dlouhé kosti atd.) (Stloukal 1999)

Za nejpřesnější metody jsou považovány analýzy chrupu, kdy určujeme tzv. zubní věk. A to jak u dětí podle mineralizace a erupce, tak v dospělosti podle změn, které chrup postihují. (Stloukal 1999)

#### **3.1 METODY ODHADU VĚKU PODLE ZUBŮ**

##### **3.1.1 MINERALIZACE ZUBŮ**

Mineralizace zubů probíhá v dětství a proto se tato metodika užívá k určení věku u dětí. Mineralizace je řízena z hypofýzy a proto je jen minimálně ovlivněna zevními vlivy. Na rozdíl od erupce, která je řízena hormony štítné žlázy a může být ovlivněna zevními vlivy. Proto je mineralizace přesnější metodou určení věku než erupce zubů.

Vývoj zubů je rozdělen do několika stadií:

1. stadium folikulu
2. stadium počínající mineralizace korunky
3. stadium pokročilé mineralizace korunky

4. stadium počáteční tvorby kořene a vytvoření spodiny dřevné dutiny
5. stadium divergence stěn kořenového kanálku (alveolární erupce, prořezání z dásně při vytvoření asi 76% délky kořene)
6. stadium paralelity stěn kořenového kanálku, zub dosahuje okluzní roviny
7. stadium konvergence stěn kořenového kanálku

Metodiku založenou na mineralizaci zubů se zabývalo mnoho autorů. Z českých autorů jsou to např. Komínek s Rozkovicovou 1984, Blajerová 1970, Pokorná a Bílý 1975, Vlček 1986 atd. Ze zahraničních autorů můžeme jmenovat např. Schranze 1959, Oliviera 1960, Ubelakera 1978, Saundersova et al. 1993. (Stloukal 1999)

Komínek et al. vypracovali na základě rtg snímků chrupu dětí Středočeského kraje a z Prahy metodiku, která detailně popisuje jednotlivá období vývoje dočasné i trvalé dentice. Tuto metodiku poté upravil Vlček, když pro snadnější hodnocení vytvořil odečítací tabulku. V Evropě je pro určování věku podle chrupu doporučována metoda podle Ubelakera. Ubelakerovo schéma uvádí jednotlivé vývojové situace a to už v období před narozením až do věku 35 let. (Stloukal 1999)

### 3.1.2 OPOTŘEBENÍ ZUBU (ABRAZE)

Od okamžiku, kdy zub prořeže z dásně, začne docházet k jeho opotřebení. Nejdříve dojde k obroušení ostrých hran. Následně dochází na kousací ploše ke zmenšování vrstvy skloviny až je obnažen dentin. Nakonec dojde k opotřebení korunky jako celku. Na opotřebení zubu mají vliv i jiné faktory než věk. Můžete to být životní styl, zdravotní stav atd. Tyto vlivy mohou mít dopad na přesnost odhadu s pomocí této metody. Touto metodou se zabývalo množství autorů např. Čechová (1972), Murphy (1959) nebo Brothwell (1980). Oproti tomu Pilín (1982) zastává názor, že korelace mezi zubní abrazí a věkem je malá. (Stloukal 1999)

Pro určení stupně opotřebení zubu se používá stupnice:

0. Bez obraze
1. Abraze skloviny, dentin není obnažen
2. Obnažený dentin na vrcholcích jednokořenových zubů, úzký proužek obnaženého

dentinu na okluzní hraně řezáku nebo na hrotu špičáků.

3. Dentin je obnažen na celé okluzní ploše.

4. Abraze a do pulpární dutiny korunky

5. Abraze až do oblasti krčku

6. Abraze až do pulpární dutiny kořene

Opotřebením kousacích ploch zubů se zabývali i další autoři jako Miles 1936, Lovejoy 1985 nebo Foundoulakis a Zafeiratos 1989.

(Stloukal 1999)

### **3.1.3 ATROFIE ZUBNÍCH LŮŽEK**

S věkem dochází k atrofii alveolu, neboli resorpci kosti. Atrofie alveolu je proces, který je velmi závislý na věku. Na druhou stranu se ve vyšším věku mohou objevovat patologické procesy, které atrofii mohou ovlivnit. Podle Pilínovy práce (1982) lze metodu použít s přesností  $\pm 5$  let u 65% osob ve věku do 45. let. U starších jedinců přesnost odhadu klesá.

(Pilín 1982)

### **3.1.4 ZTRÁTA ZUBŮ**

Ztráta zubů může posloužit v případě, že se chceme rychle zorientovat a učinit si představu o nalezených ostatcích. K přesnějšímu určení věku by ale měly být použity jiné metody.

(Stloukal 1999)

### **3.1.5 HISTOLOGICKÉ METODY**

Histologické zkoumání zubní tkáně nám nabízí množství metodik k určování věku. Pokud tyto metodiky mají být platnými pomocníky ve forenzní vědě, antropologii a archeologii je nutné, aby byly funkční a daly se prakticky využívat. Tyto metodiky, které můžeme označit za historicky mladší musí obstát v porovnání s metodami staršími, které jsou již ověřeny praxí. Mezi tyto starší metodiky můžeme zahrnout makroskopické zkoumání kostry a zubů.

Míra závislosti mezi odhadovaným a známým věkem bývá vyjádřena pomocí korelačního

koeficientu, směrodatné odchylky nebo střední chyby odhadu. Histologická metodika by měla dosáhnout korelačního koeficientu přes 0.7 nebo průměrné odchylky +/- 7 let, aby ji bylo možno považovat za stejně přesnou jako makroskopické metodiky. (Hillson 1996)

### 3.1.5.1 Gustafsonova metoda (1947)

Gustafsonova metoda je základní metodou, která používá k určení věku řezy zubem. Gustafson použil sagitální řezy silné 0,25 mm. V jeho metodice hodnotil na řezech 6 znaků. Každý z těchto znaků hodnotil 3 bodovou stupnicí. Pro určení věku používal buď 1 zub, se směrodatnou odchylkou +/- 3,6 roku nebo až 4 zuby se směrodatnou odchylkou 1,8 roku. Metoda byla velkým přínosem a posunem v metodikách určování věku. Její slabinou je, že všem hodnoceným znakům přisuzuje stejnou váhu. Někteří autoři Gustafsona následovali a jeho metodiku dále rozpracovávali.

Gustafsonova rovnice pro výpočet věku:

$$X (\text{věk}) = 11,43 + 4,56 y$$

y = součet bodového hodnocení jednotlivých znaků.

(Stloukal 1999)

Kilián et al. (1981)

Kilián je jedním z autorů, kteří dále přepracovali Gustafsonovu metodu. Kilián použil frontální zuby, které zaléval do tvrdé methylnmetacrylové pryskyřice (dentacryl) a zub pak vybrousil do sagitálního řezu o tloušťce 100-250 μm.

Kilián používá následující znaky:

**Abraze:** hodnotil rozsah abraze skloviny popř. dentinu

**Úpon gingivy:** hodnotí se jak velká část kořene je obnažena

**Sekundární dentin:** hodnotí se množství sekundárního dentinu, který je uložen v dřevné dutině

**Sekundární cement:** hodnotí se nárůst sekundárního cementu, pro hodnocení existují schémata

**Transparence kořenového dentinu:** hodnotí se rozsah transparentní zóny v kořeni

**Resorpce povrchu kořene:** hodnotí se rozsah resorpce kořene

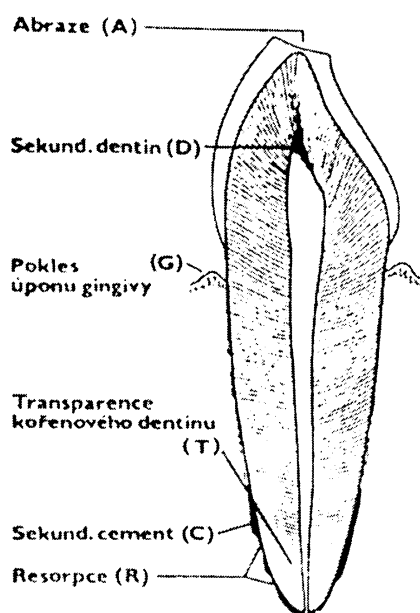
Každá z výše uvedených změn je hodnocena na stupnici od 0 do 3, přičemž se

užívají hodnoty rostoucí po půl bodu. Součet hodnot, které získáme po ohodnocení všech morfologických změn umožní jedince zařadit do věkové kategorie. Podle toho, do jaké kategorie jedinec náleží, jsou zvoleny konstanty do následujících rovnic:

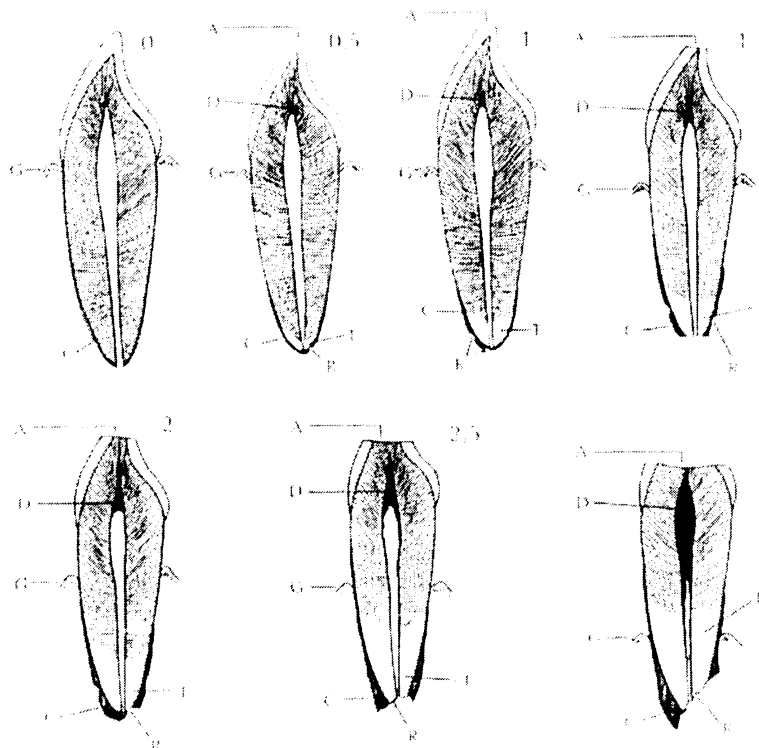
$$Y (\text{ věk}) = a + bx$$
$$= a + s_a + x(b - s_b)$$
$$= a - s_a + x(b + s_b)$$

Chyba odhadu u této metodiky je menší než +/- 3,5 roku při použití 1 zubu. Při použití více zubů je chyba max. 1,5 roku. (Kilián 1981)

Obr. 8 Involuční změny na výbrusech frontálních zubů podle Kiliána (Kilián 1981)



Obr. 9 Bodové hodnocení involučních změn sledovaných na výbrusech frontálních zubů podle Kiliána (Kilián 1981)



Johanson (1971)

Johanson upozorňoval na to, že Gustafson přiřazuje všem znakům stejnou váhu a jeho metodu upravil. Pro obě pohlaví používá stejnou rovnici.

$$X (\text{věk}) = 11,02 + 5,14A + 2,30D + 4,14 G + 3,71C + 5,57R + 8,98T$$

Pilín a Šturmankin (1987)

Autoři si uvědomili stejnou nevýhodu Gustafsonovy metody jako Johanson a proto má v jejich metodice transparence T a apozice sekundárního dentinu D větší váhu než ostatní znaky. Atrofii alveolu (vzdálenost úponu dásně od cementosklovinné hranice) nahradili vzdáleností cementosklovinné hranice od horního okraje zubního lůžka na vestibulární straně. Znak označili písmenem P.

Burns a Maples (1976)

V jejich metodě jsou používány 300 µm silné sagitální řezy, u kterých je hodnoceno



všech znaků jako u Kiliána plus některé další. Tyto přidané znaky umožňují do hodnocení zahrnout pořadí zubu, pohlaví, rasu a přítomnost paradontózy. Úspěšnost odhadu se lišila podle počtu použitých zubů a podle toho, zda byly použity zuby jednokořenné nebo vícekořenné.

(Stloukal 1999)

### 3.1.5.2 Počítání cementových linií

Pokud ponecháme stranou metody vycházející z Gustafsonovy metody existují i další histologické metodiky založené na zubech. Mezi tyto metody patří například počítání cementových linií kořene. Metody jsou založeny na faktu, že cement přirůstá v kruzích podobně jako letokruhy u stromů. Za jednu linii je označován jeden světlý a jeden tmavý pruh.

Naylor et al. (1985)

Tento autor používal odvápněné zuby a tvrdí, že linie cementu lze snadno počítat. Linie měřil na polotenkých řezech a barvil je krystalovou violetí nebo toluidinovou modří. Podle jeho zjištění je nejlepší je nejlepších výsledků dosahováno v oblasti 15 – 45% délky kořene. Věk v době smrti jedince nebo v době extrakce zubu je počítán jako počet prstenců cementu plus doba, která uplynula do prořezání daného zubu.

Scott (1980)

Ve své metodě používá nedemineralizované zuby

Někteří autoři jsou k metodě poněkud skeptičtí jako Lipsinic et al. (1986) nebo ji zcela odmítají jako Miller et al. (1988).

Charles et al (1989)

Tato metoda je jednou z nejlépe podložených a odborných metod a autoři ji doporučují k použití. Neúspěch ostatních autorů s touto metodou přisuzují malému zvětšení při posuzování linií a uvádějí, že zvětšení musí být aspoň 400 násobné. Podle jejich zjištění chyba odhadu stoupá s věkem jedince, jehož věk je odhadován. K odhadu doporučují používat třenové zuby. (Stloukal 1999)

### 3.1.5.3 Pulpodentinový index

Další možností určení věku je výpočet tzv. pulpodentinového indexu. Metoda je založena na sledování rozměrů dřevné dutiny, která se s věkem zmenšuje vlivem depozice sekundárního dentinu. Tuto metodu rozpracoval například Bayuan (1983) a na vícekořenových intaktních zubech Drusini (1991, 1997).

Bayuan et al (1983)

Autoři používali k odhadu první horní moláry. Pulpodentinový index je počítán podle následujícího vzorce:

$$\text{PDI} = (\text{výška} + \text{šířka dřevné dutiny}) / (\text{výška} + \text{šířka dentinu})$$

Věk je následně počítán podle rovnice:

$$X (\text{věk}) = 1,01 (\text{PDI}) + 82,82$$

Dřevná dutina byla měřena na řezech o tloušťce 0,5 mm a řez byl veden v bukolingvální rovině střední části zubu.

(Stloukal 1999)

Drusini (1991, 1997)

Tato metodika je založena na třenových zubech a stoličkách. Ve studii bylo použito 433 zubů od osob známého pohlaví a věku. (Drusini 1997) Tyto zuby jsou použity v intaktním stavu a pro odečítání hodnot se používají panoramatické snímky chrupu. Hodnoty jsou měřeny v mm. První měření jsou prováděna v mesiodistální rovině, kde je zjišťována výška korunky (CH). Druhou měřenou hodnotou je výška dřevné dutiny v korunce (CPCH). V bukolingvální rovině je měřen rozsah transparence kořenového dentinu (I), jako projekivní vzdálenost mezi oběma hranicemi transparence a vrcholem kořenu. Následně je počítán korunkový index TCI a index transparence y. Získané hodnoty jsou dosazovány do rovnic, které jsou sestaveny pro obě pohlaví zvlášť i dohromady.

Ve výsledcích své práce z roku 1993 autorka uvádí, že při použití korunkového indexu (CI), který získáme jako podíl výšky korunky (CL) a výšky dřevné dutiny v korunce (CPCL), je korelační koeficient mezi věkem a indexem -0,73 pro ženské moláry a -0,89 pro ženské premoláry. K získání hodnot používala rentgenové snímky. Při použití rovnic pro každé pohlaví zvlášť nebyly zjištěny signifikantní rozdíly. (Drusini 1993)

Podle výsledků autorčiny práce z roku 1997 je dosaženo chyby  $\pm 5$  let v 81,4 % případů pro mužské stoličky. Při použití stejné regresní rovnice na historický materiál bylo dosaženo chyby  $\pm 5$  let u 70,37% případů mužských molárů. (Drusini 1991, 1993, 1997)

Kvaal (1995)

Autoři se snažili o vytvoření metodiky založené na měření rozměrů dřevné dutiny na panoramatických rentgenech zubů. Byly měřeny rozměry 6 zubů obou čelistí: Maxilární první a druhý řezák, druhý premolár a mandibulární druhý řezák, špičák a první premolár. Autoři sledovali rozměry pulpy, délku kořene zubu a šířku kořene. Koeficient determinance pro odhad věku byl nejsilnější, když byly zařazeny všechny měřené zuby, a nejslabší při použití pouze mandibulárních špičáků. Měření rentgenů zubů autoři považují za vhodnou neinvazivní metodiku pro určování věku dospělých a to jak v době smrti, tak u živých jedinců. (Kvaal 1995)

#### **3.1.5.4 Barva kořene jako ukazatel chronologického věku**

Podle některých pramenů lze určovat věk na základě zbarvení kořene. Metoda je založena na předpokladu, že s věkem se zbarvení kořene mění. Bylo zjištěno, že je rozdíl v zbarvení mesiální strany zubů a zbarvení ostatních tří stran. Dále byl zjištěn rozdíl mezi stoličkami a ostatními zuby. Lackovic a Wood uvádějí, že zjistili lineární závislost mezi věkem a sytostí zbarvení kořenů. (Lackovic 2000)

#### **3.1.5.5 Poměr D- a L-aspartové kyseliny**

Metody založené na zjišťování poměru L- a D- forem aspartové kyseliny využívají faktu, že tento poměr koreluje s věkem. Pro toto určení se používají demineralizované zuby. Při demineralizaci dentinu získáme nerozpustný kolagen a rozpustné nekolagenní proteiny. Při další analýze je zjišťováno zastoupení hydrolyzovaných aminokyselin v kolagenu nebo z nekolagenních proteinů. Poměr D- a L- forem je určován pomocí plynové nebo high performance chromatografie. (Pilín 2001, Sajdok 2006)

Pilín (1982)

Další možností je využít několik vybraných znaků. Ve své studii se Pilín zajímal o závislost věku na atrofii alveolu, transparentci kořenového dentinu, počtu chybějících zubů, abrazi a minerálním složení. Zjistil, že všechny uvedené znaky kromě obsahu minerálů, mají statisticky významnou závislost s věkem. Odhad věku může být proveden na základě každého z uvedených znaků jednotlivě, ale nejlepších výsledků je dosaženo při použití všech znaků najednou. (Pilín 1982)

### **3.1.5.6 Měření šířky dentinu a cementu**

Metoda je založena na tom, že s věkem přibývá vrstva cementu a směrem do dřevné dutiny vzniká sekundární dentin. Vrstva cementu a dentinu jako celek tedy roste do šířky. Tento rozměr je posuzován v poměru k celkové šířce kořene. (Azaz 1986, 1977)

### **3.1.5.7 Transparence kořenového dentinu**

Metody využívající sledování transparentci kořenového dentinu jsou založeny na faktu, že s věkem dochází k uzavírání dentinových tubulů (sklerotizaci) ve vrstvě dentinu. Tubuly se uzavírají vlivem ukládání minerálních komponent dovnitř tubulů. Na základě tohoto procesu se mění optické vlastnosti dentinu. Za normálních okolností je dentin matný a neprůsvitný. Neprůhlednost dentinu je způsobena rozdílem v refrakčním poměru základních krystalických složek a intratubulárních organických molekul. Když se refrakční poměr vyrovná, dentin se stane průsvitným (Luna 2006). Sklerotizace postupuje od apexu zubu směrem ke korunce a od vnějšího okraje dentinu směrem ke dřevné dutině. Při řezu kolmém na podélnou osu zubu je zřejmé, že skleróza postupuje nejprve z mesialní a distální strany. Hranice mezi sklerotizovanou oblastí a nezasaženým dentinem má zoubkový vzhled, jak se skupiny nezměněných tubulů střídají s tubuly, již vyplněnými minerály. (Hillson 1996, Branko 1997, Vasiliadis 1983, Micheletti 1998)

Skleróza dentinu v korunce je ovlivněna faktem, že dentinové tubuly v této části zubu jsou vystaveny působení abraze a zubních kazů. Mendis a Darling 1977 zjistili, že rozsah sklerózy v korunce není ve spojitosti s věkem. Naopak v kořeni je rozsah sklerózy v silné korelaci s věkem. (Hillson 1996)

Vzhledem k tomu, že množství sklerotizovaného dentinu roste s věkem, lze transparentci použít jako indikátor věku. Podle zjištění Vasiliadise nemá na sklerózu vliv funkce, kterou zub vykonává nebo vnější vlivy v průběhu života. Rozložení sklerotizovaných oblastí je obdobné ve všech zubech. (Branko 1997, Vasiliadis 1983, Micheletti 1998).

Ve 20 letech je transparentní oblast silná asi 1-2 mm nebo se vůbec nevyskytuje. Transparence nezávisí na vitalitě pulpy a sklerotizace nezávisí na pohlaví. Jedinci se zuby bez transparence jsou podle studie maximálně 18 let staří a jedinci s již přítomnou transparentcí jsou alespoň 15 let staří. (Branko 1997)

Transparentní oblast se nejlépe posuzuje na příčném řezu o tloušťce 250  $\mu\text{m}$  v suchém stavu. (Hillson 1996)

Vasiliadas et al. 1983 (in Hillson 1996) zkoumali sérii příčných řezů špičáků a zjišťovali relativní tloušťku sklerotického dentinu vůči dentinu nezměněnému. Z jejich výsledků vyplývá, že největší korelaci s věkem vykazují řezy z oblasti apikální a střední třetiny kořene. (Hillson 1996)

Problémem při použití transparence dentinu jako ukazatele biologického věku je právě její trojrozměrná struktura. Pro přesné odečtení je třeba dosáhnout co nejtenčího řezu. Metodiky založené na odečítání velikosti transparentní plochy dentinu ve vztahu k celkové ploše dentinu jsou svojí přesností srovnatelné s metodami makroskopickými. Například Azaz (1977) vytvořil metodiku na základě příčných řezů a Drusini (1991) testovala metodu založenou na použití denzitometrie oproti přímému měření transparentní oblasti, ale našli mezi nimi jen malý rozdíl.

Metodami založenými na sklerotizaci dentinu, se zabýval např. Micheletti nebo Branko.

(Branko 1997, Micheletti 1998, Vasiliadis 1983)

Branko Ermenc (1997)

Podle autora je transparence kořenů normálním jevem, který doprovází stárnutí člověka a považuje ji za důležitý fenomén při určování věku. Autor uvádí, že metody založené na abrazi, sekundárním dentinu, sekundárním cementu, stavu parodontu a resorpci kořene jsou méně spolehlivé, protože uvedené znaky ovlivňují i jiné faktory než věk. Na

druhé straně je stárnutí člověka provázeno uzavíráním dentinových tubulů a následně transparentí kořenového dentinu. Transparentci je relativně snadné měřit a statisticky vyhodnocovat. Ve své studii autor měřil transparentci na řezech jednokořenových zubů horní i dolní čelisti. Transparentní oblast měřil od apexu směrem ke korunce v milimetrech s přesností 0,5 mm. Ve výsledcích uvádí, že transparentce roste lineárně s věkem a mezi věkem a transparentcí udává silnou korelaci (korelační koeficient = 0,95,  $p < 0,0061$ ). (Branko 1997)

### 3.1.5.8 Sklerotizace dentinových tubulů

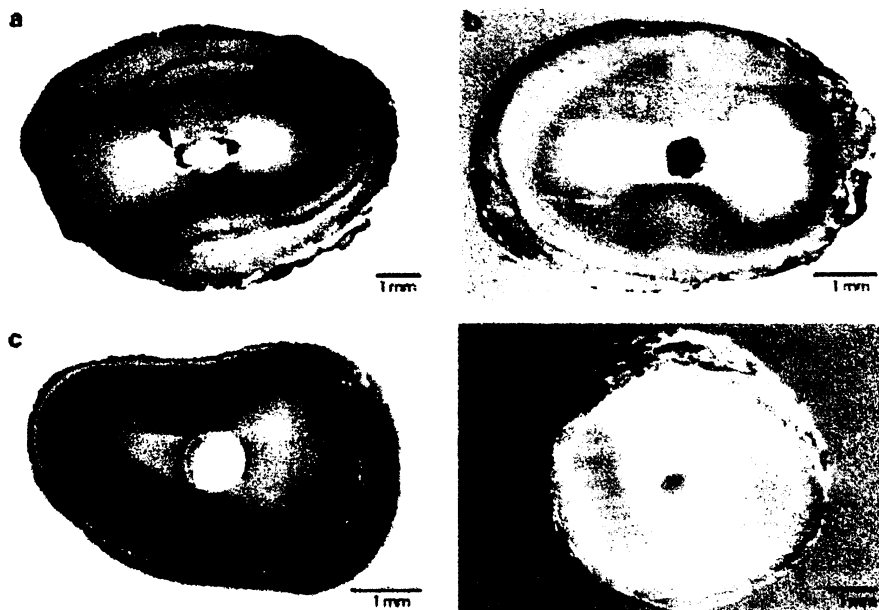
Sklerotizace dentinových tubulů je jev úzce související s transparentí kořenového dentinu. V práci Paqué (2006), která se zabývali klinickými problémy s denticí se uvádí metoda barvení těchto tubulů. V případě této práce byly zuby vystavovány různým chemikáliím a byl sledován jejich vliv na kořenový systém. Pro odhady věku je důležitá ta část metody, kde byla sledována propustnost kanálů. U každého zubu byla odstraněna korunka a do kořenového systému byla vpravena barva. Kořeny všech zubů byly dále nařezány na příčné řezy a byla sledována obarvená plocha. Jak bylo již výše vysvětleno vlivem ukládání minerálů do dentinových tubulů se tyto postupně uzavírají. To znamená, že tam, kde jsou kanály již uzavřeny, nemá barva již možnost prostoupit do systému dentinových kanálů a obarví pouze tu část dentinu, kde kanály ještě nejsou uzavřeny.

Podle výsledků práce Paqué (2006) je možné tímto způsobem dentin barvit a navíc obarvené plochy v různých částech kořene odpovídají postupu dentinové sklerózy. Dentinová skleróza má svůj počátek v apikální části kořene a postupem času se rozšiřuje směrem ke korunce. Autoři článku zjistili, že penetrace je signifikantně vyšší v koronální části kořene než v jeho středu a penetrace barvy ve středu kořene je zase vyšší než v jeho apikální části. Podle jejich výsledků je penetrace barvy závislá na dentinové skleróze více než na čemkoli jiném.

Ve většině případů měla obarvená plocha tvar motýla. Širší rozpětí je v bukolingválním směru, užší naopak v mesiodistálním. Je to způsobeno tím, že uzavírání tubulů probíhá rychleji v mesiálním a distálním směru. Při vyhodnocování řezů autoři fotografovali plochy dentinu a následně je vyhodnocovali tak, že počítali procentuální zastoupení obarvené plochy dentinu k velikosti celého dentinu. Problémem při

vyhodnocování vzorků se stala relativní průhlednost dentinu. Díky tomu měřená obarvená oblast nereprezentuje jenom plochu řezu, ale do jisté míry i oblasti pod řezem, které na povrch prosvítají. ( Paqué 2006)

Obr. 10 Obarvené řezy zubů s různým stupněm propustnosti dentinových tubulů (Paqué 2006)



(a, b) Řez kořenem s obarvenou plochou motýlovitého tvaru

(c) Vzorek s úplnou propustností dentinových tubulů

(d) Vzorek s minimální propustností dentinových tubulů

## 4. MATERIÁL

V této diplomové práci bylo použito 46 zubů různých jedinců. Všechny zuby souboru byly recentní a byly získány ze soukromých stomatologických praxí v Praze a Tachově, Ústavu soudního lékařství a toxikologie UK 1. LF v Praze a Stomatologické kliniky 1.LF UK v Praze. Zubů získaných ze soukromých stomatologických praxí byla většina (43 zubů) a jednalo se o zuby vytržené z ortodontických důvodů.

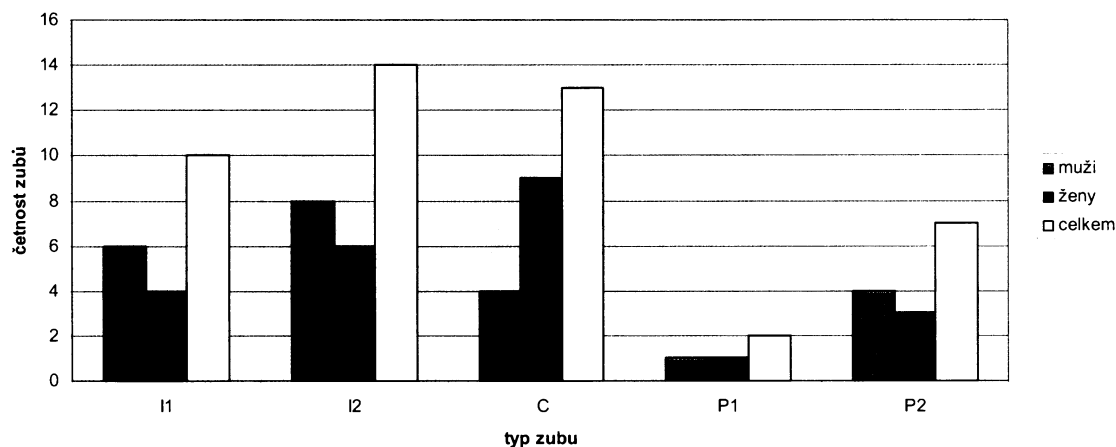
Do souboru byly vybírány zuby jednokořenné. Věkové složení souboru je od 14 let do 85 let. Z celkového počtu 46 jedinců v souboru bylo 23 žen a 23 mužů. Složení souboru a četnost zastoupení jednotlivých zubů jsou uvedeny v následující tabulce a grafu.

Tab. 4 Zastoupení jednotlivých typů zubů v souboru, rozdělení podle pohlaví

Typ zuby	Počet zubů ve skupině		
	muži	ženy	Celkem
I1	6	4	10
I2	8	6	14
C	4	9	13
P1	1	1	2
P2	4	3	7
Celkem	23	23	46

Graf 1. Četnost zubů ve skupinách podle typu zuby a pohlaví

Četnost zubů ve skupinách podle typu zuby a pohlaví





V následující tabulce jsou uvedeny všechny zuby, které byly do souboru zařazeny. U každého zubu je uvedeno o jaký typ zubu se jedná a věk a pohlaví jedince, jemuž byl zub extrahován.

Tab. 5 Přehled všech zubů zařazených do souboru (typ zubu, pohlaví, věk)

pořadové číslo	číslo vzorku	typ zubu	pohlaví	chronologický věk
1	1	22	muž	34
2	3	41	žena	57
3	4	42	žena	57
4	6	31	muž	59
5	7	33	muž	44
6	9b	42	muž	42
7	10b	32	muž	41
8	11b	41	muž	23
9	12b	42	muž	38
10	14b	33	žena	53
11	15	43	žena	39
12	19	32	muž	62
13	S1c	22	žena	63
14	S3c	32	žena	64
15	S5	35	muž	56
16	S6	35	žena	63
17	K1	41	muž	56
18	S9b	42	muž	37
19	S10a	11	žena	56
20	S11	34	žena	31
21	S13	31	muž	85
22	S15c	42	muž	63
23	Ma1c	42	muž	40
24	S17	43	žena	73
25	S18	23	žena	61
26	KB4	23	muž	14
27	KB8	21	muž	44
28	KB9	43	žena	67
29	KB10	25	muž	45
30	St2	22	žena	59
31	St4	25	žena	49
32	St5	12	žena	63
33	St7b	21	muž	66
34	PH3	35	muž	77
35	S19	34	muž	59

Tab. 5 Přehled všech zubů zařazených do souboru (typ zubu, pohlaví, věk) - pokračování

36	S23a	11	žena	57
37	St10	15	žena	35
38	St12	32	žena	57
39	St16	23	žena	56
40	DH1	13	žena	60
41	St17	33	muž	64
42	S12	13	žena	54
43	S14	13	žena	60
44	PH2	43	muž	73
45	S21	21	žena	45
46	St14	35	muž	25

Při vyhodnocování byly všechny vzorky zahrnuty do jedné skupiny. Rozdělení na pohlaví nebylo provedeno z důvodu malého počtu vzorků a také proto, že u transparence většina autorů uvádí, že pohlaví na ní nemá vliv (Burn 1976, Maples 1978 in Drusini 1990). Pouze Johanson 1971 a Drusini 1991 uvádí mírně lepší korelaci u žen. Drusini 1991 také uvádí, že není rozdíl mezi zuby extrahovanými a zuby získanými z kosterních ostatků. Současně uvádí, že není rozdíl mezi zuby horní a dolní čelisti (Johanson 1968, Bang 1970, Johanson 1971, Solheim 1989 in Drusini 1991). Solheim nenašel rozdíl ani mezi zuby pravé a levé strany, mezi různými typy zubů a tvrdí, že transparence není ovlivněna periodontálními nemocemi (Solheim 1989 in Drusini 1991). (Drusini 1990, 1991)

## 5. METODIKA

### 5.1 POUŽITÁ METODIKA

Metodika použitá v této diplomové práci se odvíjí od metodiky použité v práci Paqué (2006). Základy metodiky byly mírně upraveny a použity pro odhady věku. Nejedná se o úplně stejné hodnocení, jakým je hodnocení transparence, protože v dentinu dochází k optickým změnám, tedy transparenci, ještě před tím, než jsou všechny tubuly uzavřeny (Balooch 2001).

V tomto případě je tedy sledováno pouze uzavírání tubulů minerály nikoliv transparence kořenového dentinu jako taková, přestože spolu úzce souvisí. V metodě použité v této diplomové práci jsme vyšli z možnosti zobrazit otevřené tubuly pomocí barvy. Jako vhodná barvivo byl vybrán a použit 1% roztok toluidinové modři.

Aby byla barva co možná nejšetněji vpravena do tubulů, byla použita tenká jehla a injekční stříkačka. Jehla byla do kořenového kanálku vpravována přes otvor, jímž kanálek ústí na povrch kořene. Některé kanálky neústí na povrch jedním otvorem, ale může jich být i více. V těchto případech jsou otvory většinou menší, než když se jedná pouze o jedno vyústění. Obecně se jevílo snazší barvení zubů horní čelisti. Zuby dolní čelisti jsou mesiodistálně zploštělé a tento jev vede k tomu, že je obtížnější do jejich kanálků proniknout jehlou.

Po obarvení byly zuby zalévány do dentacrylu. Po zatvrdnutí dentacrylu byl z každého zubu zhotoveny 3 výbrusy. Výbrusy na základě výsledků uvedených v článku Paqué (2006) byly zhotovovány v  $\frac{1}{4}$ , v  $\frac{1}{2}$  a  $\frac{3}{4}$  délky kořene. Celková délka kořene byla vždy měřena na mesialní ploše zubu. Výbrusy byly řezány pomocí brusného kotoučku a následně pomocí ruční pilky. Použití brusného kotoučku se neosvědčilo kvůli příliš častému poškození vzorku. Byly zhotovovány výbrusy o tloušťce 0,5 mm. Další ztenčování výbrusu se neprovádělo z důvodu pracnosti, časové náročnosti daného procesu a vysokého rizika poškození vzorku. Hotové výbrusy byly pozorovány pod stereomikroskopem pod 20 násobným zvětšením a následně fotografovány s použitím fotoaparátu Leica DC 150. Fotografie výbrusů pak byly vyhodnoceny pomocí počítačového programu tps dig. Tento počítačový program umožňuje měření označené plochy. Program počítá velikost plochy

v pixelech. V případě měření dentinu byla změřena obarvená plocha a poté celková plocha dentinu. Obarvená plocha byla dána do poměru s celkovou plochou dentinu.

Výsledkem takto zpracovaného zubu jsou 3 hodnoty. Každá hodnota je poměrem části dentinu s otevřenými dentinovými kanály a celkové plochy dentinu. Pro každý zub je tato hodnota získána ze 3 řezů. U některých zubů není trojice výsledků kompletní. Ke ztrátě hodnot mohlo dojít z několika důvodů - např. poškození nebo zničení vzorku, neprostupnost dřeňové dutiny pro barvu.

### **5.1.1 PRACOVNÍ POSTUP ZALÉVÁNÍ TVRDÝCH ZUBNÍCH TKÁNÍ A JEJICH DALŠÍ ZPRACOVÁNÍ**

#### **1. Příprava vzorků**

Zuby pečlivě očistíme od zbytků měkkých tkání a dalších nečistot, které na nich mohly ulpět. Omyjeme je pod tekoucí vodou a necháme oschnout při pokojové teplotě.

#### **2. Fixace tkáně**

Zuby vložíme do kádinky s roztokem 10% formolu tak, aby byly celé zuby pod hladinou a ponecháme je tak minimálně 24 hodin. Po uplynutí této doby zuby z roztoku vyjmeme a necháme je minimálně 2 hodině vyprat pod tekoucí vodou. Nakonec zuby omyjeme v destilované vodě a necháme dobře oschnout při pokojové teplotě alespoň 12 hodin.

#### **3. Barvení**

Zuby barvíme 1% roztokem toluidinové modři. Barvení provádíme pomocí tenké jehly a to přes kořenový kanálek a foramen apicis dentis. Jakmile je zřetelné, že barva do dřeňové dutiny proniká, plníme zub barvou pod stálým tlakem po dobu alespoň 5 sekund. Přebytkovou barvu z povrchu zubu odmyjeme ponořením zubu do destilované vody. Abychom získaly jistotu, že barva měla dostatek času zaschnout, ponecháme zuby při pokojové teplotě vysychat minimálně 24 hodin.

#### **4. Zalítí zubu do pryskyřice**

Nejprve zub ponoříme na dobu jedné hodiny do monomeru dentacrylu. Pro každý

zub si připravíme zalévací komůrku vhodné velikosti. Připravíme metylmetakrylovou pryskyřici, dentacryl. Dentacryl je připravován z tekutého monomeru a práškového polymeru. Množství obou složek je voleno tak, aby vznikla vhodná konzistence látky pro zalévání. Pryskyřice nesmí být příliš tekutá, aby mohlo být dosaženo dostatečné tvrdosti. Naopak v příliš husté pryskyřici by vznikaly při zalévání bubliny, které by již neměly možnost unikát a později by mohly komplikovat tvorbu výbrusů. Celý proces tuhnutí pryskyřice trvá zhruba 3 hodiny podle velikosti vzorku. Při tomto procesu se celý bloček zahřívá.

#### 5. Výbrusy

Po ztvrdnutí pryskyřice vyjmemé hotové bločky ze zalévacích komůrek. Poté změříme celkovou délku kořene a vyznačíme si místo řezu v  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$  a  $\frac{3}{4}$  délky kořene. Zub v dentacrylovém bločku uchytneme do svěráku a v požadovaných oblastech vyřežeme 1 mm silné plátky. Tyto plátky pryskyřice obsahující řez zubním kořenem následně zbrousíme na smirkovém papíře do tloušťky 0,5 mm a vyhladíme jejich povrch do požadovaného vzhledu.

#### 6. Zhotovení fotografií výbrusů

Takto zhotovené výbrusy pozorujeme pod binokulárem pod 20násobným zvětšením a následně fotografujeme pomocí digitálního fotoaparátu Leica DC150. Fotografie jsou automaticky ukládány do počítače.

#### 7. Vyhodnocení fotografií

Získané fotografie vyhodnocujeme pomocí počítačového programu tpsdig1. Tento program umožňuje měření označených ploch.

## 5.2 BARVENÍ POMOCÍ HISTOCHEMICKÝCH REAKCÍ

Jak již bylo zmíněno výše lze touto metodou dosáhnout tloušťky řezu 0.5 mm. Vzhledem k trojrozměrným vlastnostem dentinu je u vyhodnocování problém určit, kam až sahá barva ve vrstvě, kterou hodnotíme a kde už prosvítají vrstvy hlubší. Proti tomuto jevu je jediným možným opatřením získání tenčího řezu. Jak jsem již uvedla, je práce s výbrusem velmi jemná a při tenčích plátcích může dojít k vypadnutí kořene z ploténky a následně k jeho poškození a tím zničení celého vzorku.

Na základě tohoto problému bylo jedním z řešení použití dekalcifikované tkáně. Nejprve bylo nutné vybrat dekalcifikační metodu a poté ověřit, jestli je vhodná pro naše potřeby.

K dekalcifikaci byla vybrána metodika ověřená v naší laboratoři, jež je popsána v diplomové práci zabývající se aposicí cementu (Taušnerová 2007). Postup přípravy zubů a jejich barvení zůstává víceméně stejný jako v případě nedekalcifikovaných výbrusů.

Postup vlastní dekalcifikace a zalití vzorků je následující:

#### 1) Dekalcifikace

Fixované a obarvené zuby jsou vloženy do 10 % vodného roztoku EDTA Na<sub>2</sub> (Chelaton III). Zuby jsou v roztoku ponechány při pokojové teplotě a roztok je pravidelně měněn každý den. Proces trvá zhruba 8 týdnů. Záleží na velikosti vzorku a na tom jak důkladné odvápnění vzorku požadujeme. Po skončení dekalcifikace je nutné vzorky vyprat pod tekoucí vodou alespoň po dobu 24 hodin.

#### 2) Odvodnění vzorků

Aby bylo možné zuby dále zpracovávat musí být nejprve odvodněny. Toho je docíleno pomocí vzestupné etanolové řady. Vzorky umístíme do roztoků etanolu s postupně se zvyšující koncentrací. Etanol tak postupně z tkáně vytlačí veškerou vodu. Používají se roztoky etanolu o koncentraci 70 %, 80 % a nakonec 96 %. Doba působení jednotlivých lázní je uvedena v následující tabulce.

Tab.6 Přehled odvodňování roztokem etanolu.

Koncentrace etanolu	Doba působení (v hodinách)
70 %	4
80 %	6
96 %	6
96 %	4
96 %	4

(Vacek 1988)

### 3) Prosycení tkáně látkou rozpouštějící Paraplast® X-TRA

Aby bylo docíleno prosycení tkáně musí být vzorky umístěny do 3 po sobě jdoucích xylenových lázní alespoň na dobu 15 minut.

### 4) Prosycení tkáně Paraplastem® X-TRA

Paraplast X-TRA je zalévací medium, konzistencí podobné vosku. Po prosycení zubu xylenem je nutné je okamžitě přenést do kádinky s rozpuštěným 100 % Paraplastem X-TRA. Tuto kádinku doporučuje autorka umístit na dobu 4 hodin do termostatu nastaveného na 60°C a nechat vytékat xylenové páry. Tyto lázně je nutno několikrát opakovat a prodlužovat dobu působení paraplastu a tedy i pobyt v termostatu.

### 5) Zalítí vzorků

Takto připravené zuby můžeme zalít Paraplastem® X-TRA do připravených zalévacích komůrek jako v případě dentacrylu. Po zatvrdnutí je možné zuby krájet na mikrotomu na řezy o tloušťce 10 – 15 µm.

Základním problémem použití této metody je to, že toluidinová modř by se v průběhu dekalifikace ze zubů mohla vymývat. Bylo tedy nutné najít jinou barvu, která by proces dekalifikace vydržela.

K tomuto účelu byla nakonec vybrána látka, která vytváří nerozpustnou sraženinu. Jedná se o DAB- 3,3'- diaminobenzidine tetrahydrochlorid. Roztok 0,06% DAB v PBS je kapalina s mírně hnědavým zabarvením, která při kontaktu s oxidačním činidlem vytváří tmavě hnědou sraženinu. Tato látka, která se běžně používá k histochemickému barvení, byla zvolena k otestování.

Aby bylo možno ověřit, zda je DAB vhodnou chemikálií, byl připraven test. Po obarvení zubů bylo v plánu je umístit do 1 % roztoku peroxidu vodíku, aby se v nich vytvořila sraženina a následně pokračovat v dekalifikaci podle výše zmíněného postupu. Z tohoto důvodu byl připraven pokus. V rámci tohoto pokusu byl k 1ml roztoku DAB přidán 1ml 1 % roztoku peroxidu vodíku. Bylo použito 10 zkušebních vzorků. V průběhu několika dní se vytvořila ve všech zkumavkách hnědavá sraženina. Pro zjištění zda se tato sraženina nerozpouští působením nějaké látky potřebné k dekalifikaci byla použita spektrometrie.

Vlnová délka při které DAB absorbuje světlo je 465 nm. (Fahimi 1973) U všech připravených vzorků byla nejprve odstředěna sraženina, která v roztoku vznikla a poté měřena absorpce supernatantu při 465 nm. V této vlnové délce byla absorbance supernatantu nulová, protože veškerá barva byla zachycena v odstředěné sraženině.

Ke zbytku supernatantu se sraženinou byly vždy po 2 vzorcích přidány postupně všechny látky potřebné pro dekalifikaci, tedy EDTA, xylen a etanol. Vzniklý roztok byl vždy pečlivě protřepán a posléze znovu odstředěn. Vzniklé supernatanty byly znovu měřeny v oblasti absorpce DAB.



## 6. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ

Výsledky získané v této práci byly vyhodnocovány pomocí lineární regrese v programu Statistica verze 6.0.

### 6.1 JEDNODUCHÁ LINEÁRNÍ REGRESE

Jednoduchá lineární regrese popisuje lineární závislost mezi dvojicí číselných proměnných. Tuto závislost můžeme obecně popsat pomocí následující regresní rovnice

$$Y = \beta_0 + \beta_1 * X + e,$$

kde  $Y$  je závisle proměnná,  $X$  je nezávisle proměnná,  $\beta_0$  a  $\beta_1$  jsou regresní koeficienty (absolutní a lineární člen) a  $e$  je náhodná chyba. Regresní koeficienty  $\beta_0$  a  $\beta_1$  se odhadují metodou nejmenších čtverců a jejich odhady získané pomocí statistických programů se značí  $b_0$  a  $b_1$ .

Mezi výsledky lineární regrese patří Pearsonův korelační koeficient  $r$ , koeficient determinance  $r^2$ ,  $p$ -hodnota a parametry regresní rovnice, které charakterizují závislost mezi proměnnými. Rovnice popisující tuto závislost můžeme zapsat v obecném tvaru takto:

$$Y = b_0 + b_1 * x$$

### 6.2 VÍCENÁSOBNÁ LINEÁRNÍ REGRESE

Jako další možnost byla zkoumána závislost logaritmu chronologického věku na hodnotách získaných ze všech 3 řezů najednou. Takto získaný model je potom charakterizován rovnicí jejíž obecný zápis je:

$$Y = b_0 + b_1 * x_1 + b_2 * x_2 + b_3 * x_3$$

$b_0$  je opět odhad absolutního členu a hodnoty  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$  jsou odhady lineárních členů odpovídající jednotlivým indexům transparency ( $x_1$  je hodnota měření získaných z řezu v  $\frac{1}{4}$  délky kořene,  $x_2$  z  $\frac{1}{2}$  délky kořene a  $x_3$  z  $\frac{3}{4}$  délky kořene).

## 6.3 SPERMANŮV KORELAČNÍ KOEFICIENT

U všech proměnných byla pomocí Shapiro-Wilkova testu zjišťována normalita rozdělení dat. U žádné proměnné nebyla normalita potvrzena, což znamená, že žádná z proměnných nemá normální rozdělení. Vzhledem k tomu, že lineární regrese předpokládají normalitu dat, nemusely by výsledky z nich získané být správné.

Z tohoto důvodu byla testována ještě závislost pomocí Spearmanova korelačního koeficientu, který je určený pro nenormálně rozdělená data.

## 6.4 STANOVENÍ CHYBY ODEČTU

Při opakovaných měřeních je třeba určit míru správné opakovatelnosti měření. Tuto míru lze určit pomocí koeficientu reliability R. Koeficient reliability můžeme vypočítat pomocí vzorce (Šmahel 2001)

$$R = \frac{s^2_{celk} - s^2_{chyb}}{s^2_{celk}},$$

kde  $s^2_{celk}$  je celková variance a  $s^2_{chyb}$  je chybový rozptyl daného znaku.

Chybu měření stanovujeme pro 1 pozorovatele z jeho opakovaných měření téhož znaku jako tzv. intraindividuální chybu. Dále stanovujeme chybu měření mezi 2 pozorovateli z jejich měření týchž znaků jako tzv. interindividuální chybu.

Hodnota koeficientu reliability by měla být vyšší než 0,9. Pokud je jeho hodnota nižší než 0,8 znamená to, že měření nemá smysl, protože více jak 20% rozptylu znaku je způsobeno chybou měření.

## 7. VÝSLEDKY

Při vyhodnocování řezů kořene byly u každého řezu získány dvě hodnoty. Těmito hodnotami byly plocha obarveného dentinu a plocha celkového dentinu. Tyto hodnoty byly dány do poměru, který je dále označován jako index transparence.

$$\text{Index transparence} = \text{obarvená plocha dentinu} / \text{celková plocha dentinu}$$

Celé měření bylo provedeno dvakrát a pro každý zub tak byly získány dva poměry ploch pro každý řez. Tyto dva poměry byly využity pro výpočet interindividuální chyby a dále z nich byly vytvořeny průměrné hodnoty pro všechny zuby. Tyto hodnoty jsou dále značeny jako Index transparence 1 pro průměrnou hodnotu získanou ze 2 měření téhož řezu z ¼ délky kořene, Index transparence 2 pro průměr ze 2 měření téhož řezu v ½ délky kořene a Index transparence 3 pro řez ze ¾ délky kořene.

Tab. 7 Přehled výsledků

pořadové číslo	číslo vzorku	typ zubu	pohlaví	chronologický věk	Index transparence 1	Index transparence 2	Index transparence 3
1	1	22	muž	34	0,0874	0,1392	0,4158
2	3	41	žena	57	0,0140	0,0874	0,0459
3	4	42	žena	57	0,0226	0,0711	0,1198
4	6	31	muž	59	0,0000	0,0503	0,0070
5	7	33	muž	44	0,0000	0,0349	0,0577
6	9b	42	muž	42	0,0871	0,1951	0,0000
7	10b	32	muž	41	0,0994	0,2296	0,0165
8	11b	41	muž	23	0,0000	0,2097	0,1012
9	12b	42	muž	38	0,1132	0,0758	0,1182
10	14b	33	žena	53	0,0778	0,0994	0,1744
11	15	43	žena	39	0,0157	0,0309	0,0701
12	19	32	muž	62	0,0000	0,0088	0,0041
13	S1c	22	žena	63	0,0087	0,0346	0,0061
14	S3c	32	žena	64	0,0215	0,0678	
15	S5	35	muž	56	0,0268	0,0068	0,0081
16	S6	35	žena	63	0,0034	0,0000	0,0000
17	K1	41	muž	56	0,0000	0,0000	0,0000
18	S9b	42	muž	37	0,1100	0,1703	0,2032
19	S10a	11	žena	56	0,0185	0,0573	0,0190
20	S11	34	žena	31	0,0102	0,0922	0,1216

Tab. 7 Přehled výsledků - pokračování

21	S13	31	muž	85	0,0000	0,0000	0,0000
22	S15c	42	muž	63	0,0000	0,0066	
23	Ma1c	42	muž	40	0,1087	0,1006	0,0243
24	S17	43	žena	73	0,0000	0,1058	
25	S18	23	žena	61	0,1592		
26	KB4	23	muž	14	0,6603	0,5883	0,4746
27	KB8	21	muž	44	0,3543	0,0609	0,0000
28	KB9	43	žena	67	0,1549	0,0965	0,0022
29	KB10	25	muž	45	0,0638	0,0299	0,0052
30	St2	22	žena	59		0,0165	0,0295
31	St4	25	žena	49	0,0069	0,0583	0,0222
32	St5	12	žena	63	0,0000	0,0000	0,0000
33	St7b	21	muž	66	0,0072	0,0989	0,0697
34	PH3	35	muž	77	0,0065	0,0245	
35	S19	34	muž	59	0,0000	0,0296	0,0748
36	S23a	11	žena	57	0,0000	0,0344	0,0404
37	St10	15	žena	35	0,0217	0,2155	0,0468
38	St12	32	žena	57	0,0000	0,0441	0,0642
39	St16	23	žena	56	0,0000	0,0684	0,0116
40	DH1	13	žena	60	0,0026	0,2114	0,3605
41	St17	33	muž	64	0,0000	0,1194	0,0789
42	S12	13	žena	54	0,0046	0,3419	0,2127
43	S14	13	žena	60	0,0000	0,2993	0,2539
44	PH2	43	muž	73		0,2353	0,0000
45	S21	21	žena	45	0,1998	0,3519	0,3860
46	St14	35	muž	25	0,0679	0,0000	

U každé z těchto hodnot byl následně zkoumán její vztah k chronologickému věku. Zjišťovala jsem zda mezi věkem a těmito indexy transparence existuje závislost. Nejprve byla zjišťována závislost mezi indexy transparence a skutečným věkem jedinců zahrnutých v souboru. Poté byl také zjišťován vztah mezi indexy transparence a věkem korigovaným. Korigovaný věk byl získán tak, že každého jedince byl od jeho věku odečten určitý počet let. Tento počet let odpovídá době, kdy prořezává zub, který byl od daného jedince použit. Bylo tak tedy počítáno pouze s věkem od erupce zubu nikoli celkovým věkem jedince. Tato korekce byla provedena proto, že k transparenzi začíná docházet až po ukončení vývoje zubu.

Ze získaných výsledků bylo vytvořeno několik modelů. Nejprve jsou uvedeny výsledky pro neupravený věk a v druhé části výsledky s korigovaným věkem podle typu

zubu.

Nejprve byla sledována závislost mezi jednotlivými indexy transparence a věkem. Vzhledem k charakteru dat bylo zjištěno, že lepších výsledků bude dosaženo, pokud místo hodnoty chronologického věku použijeme jeho přirozený logaritmus. Tato hodnota je dále označována jako ln věk.

Na základě obecné rovnice lineární regrese můžeme pro naše modely použít rovnici:

$$\text{Ln věk} = b_0 + b_1 * \text{index transparence},$$

kde Y představuje ln věk, x jeden z indexů transparence a  $b_0$ ,  $b_1$  jsou regresní koeficienty ( $b_0$  je odhadem absolutního členu,  $b_1$  je odhadem lineárního členu).

## 7.1 JEDNODUCHÁ LINEÁRNÍ REGRESE PRO CHRONOLOGICKÝ VĚK

Jak již bylo řečeno byl výpočet jednoduché lineární regrese použit pro každý index transparence zvlášť. Výsledkem bylo získání 3 modelů. Model 1 pro index transparence 1, model 2 pro index transparence 2 a model 3 pro index transparence 3. Získané hodnoty jsou uvedené v následující tabulce.

Tab. 8 Získané modely jednoduché lineární regrese

	$b_0$	$b_1$	$r^2$	r	p-hodnota
Model 1	4,00440	-1,72911	0,34580938	0,58805560	0,000027
Model 2	4,06545	-1,43292	0,24427550	0,49424235	0,000559
Model 3	4,01540	-1,28986	0,24138095	0,49130535	0,001285

### 7.1.1 MODEL 1

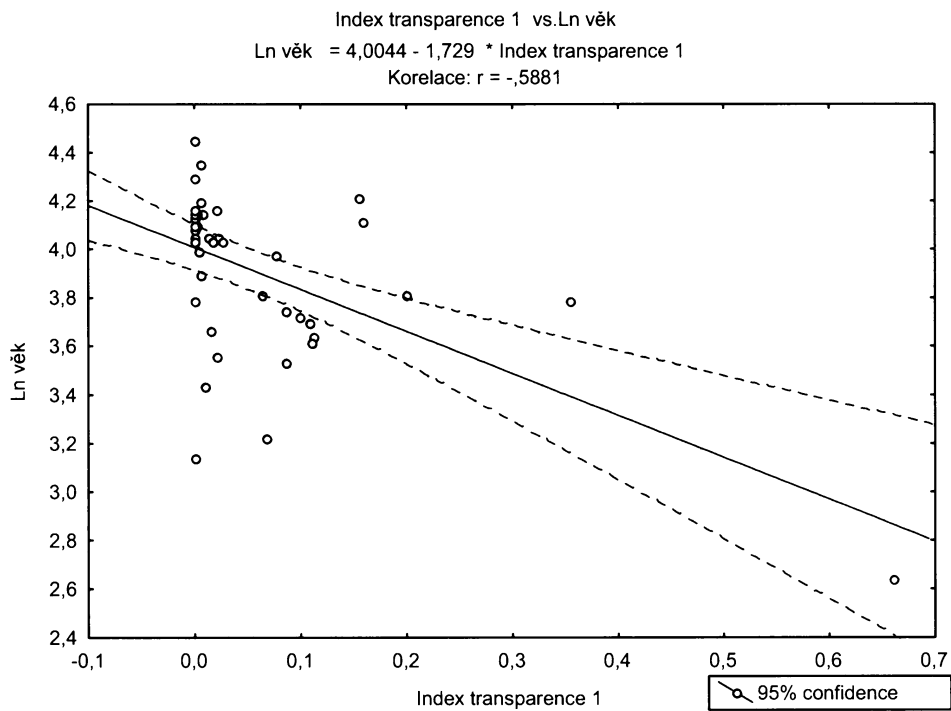
Na základě těchto výsledků lze model 1 zapsat jako:

$$\text{Ln věk} = 4,0044 - 1,72911 * \text{index transparence 1}$$

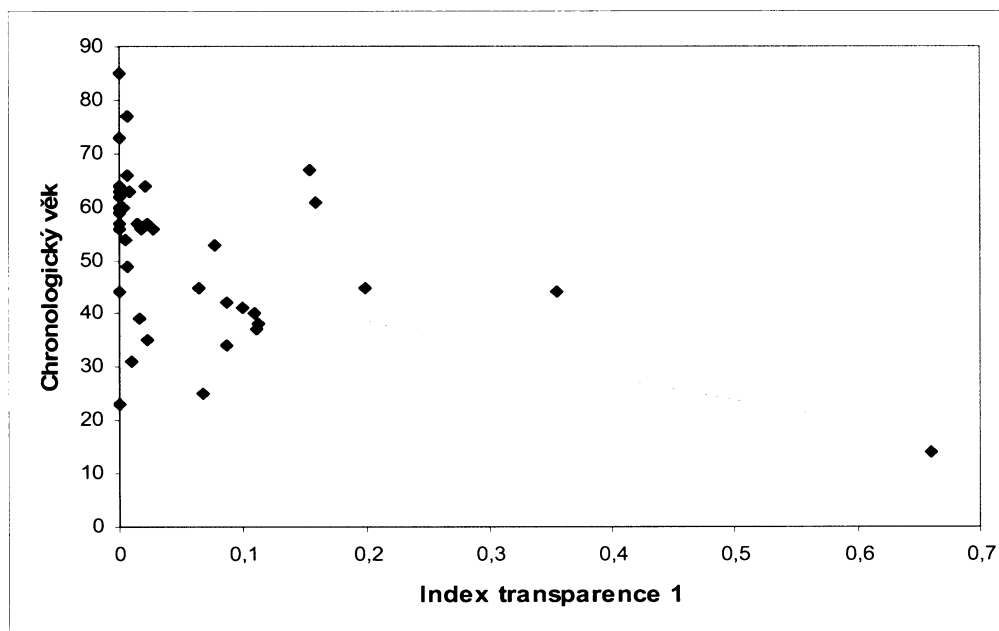
Tento model nám vysvětluje 34,5% variability závisle proměnné (logaritmu chronologického věku) a závislost byla prokázána na 5% hladině významnosti ( $p =$

0,000027). Hodnota Pearsonova korelačního koeficientu je 0,58.

Graf 2 Závislost logaritmu věku na Indexu transparence 1



Graf 3 Závislost chronologického věku na Indexu transparence 1



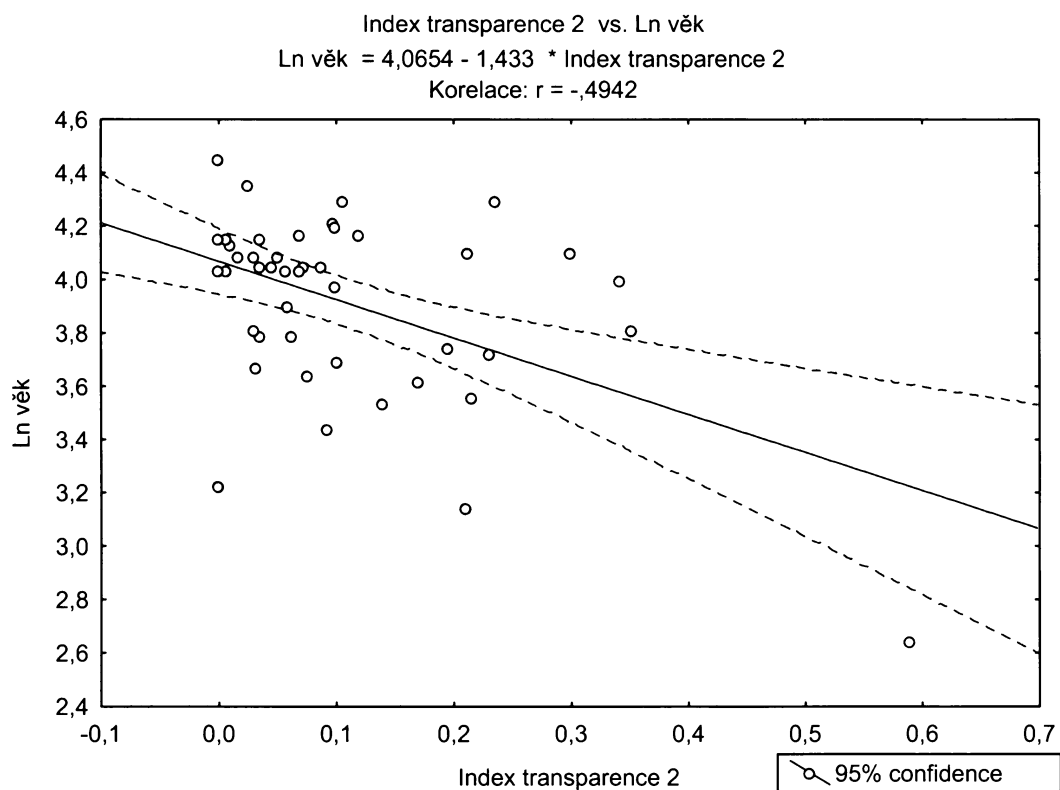
## 7.1.2 MODEL 2

Tento model je charakterizován rovnicí:

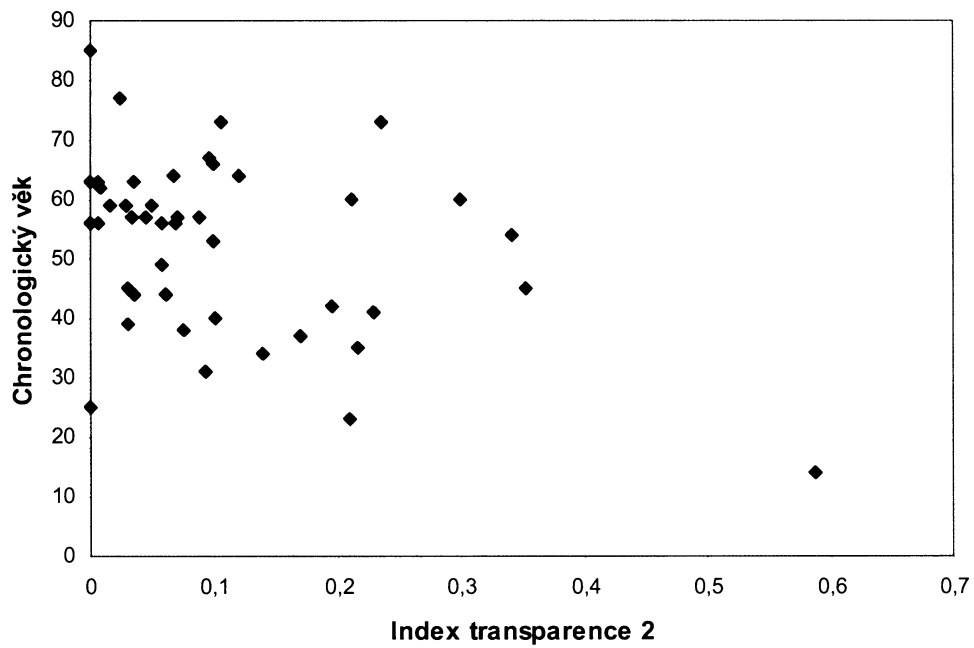
$$\text{Ln věk} = 4,06545 - 1,43292 * \text{index transparence 2}$$

Model vysvětluje 24,5% variability logaritmu chronologického věku a na 5% hladině významnosti potvrzuje závislost mezi proměnnými ( $p = 0,000559$ ). Hodnota Pearsonova korelačního koeficientu je 0,49.

Graf 4 Závislost logaritmu věku na Indexu transparence 2



Graf 5 Závislost chronologického věku na Indexu transparence 2



### 7.1.3 MODEL 3

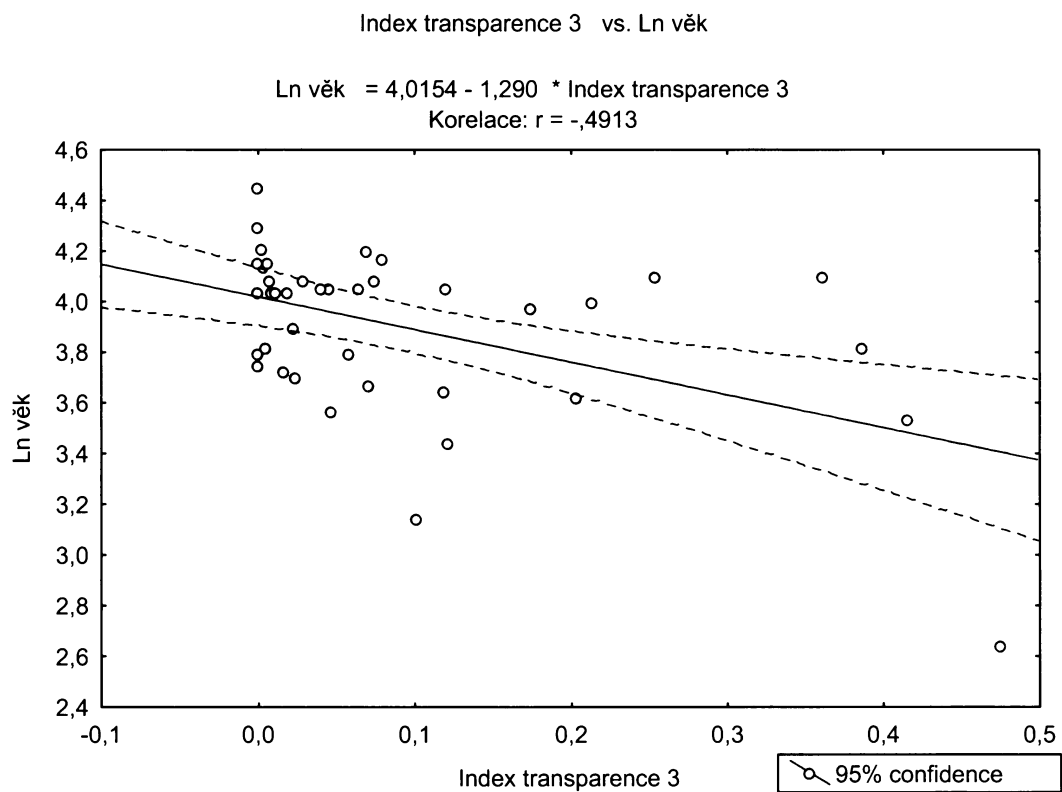
Model 3 představuje rovnice:

$$\text{Ln věk} = 4,01540 - 1,28986 * \text{index transparence 3}$$

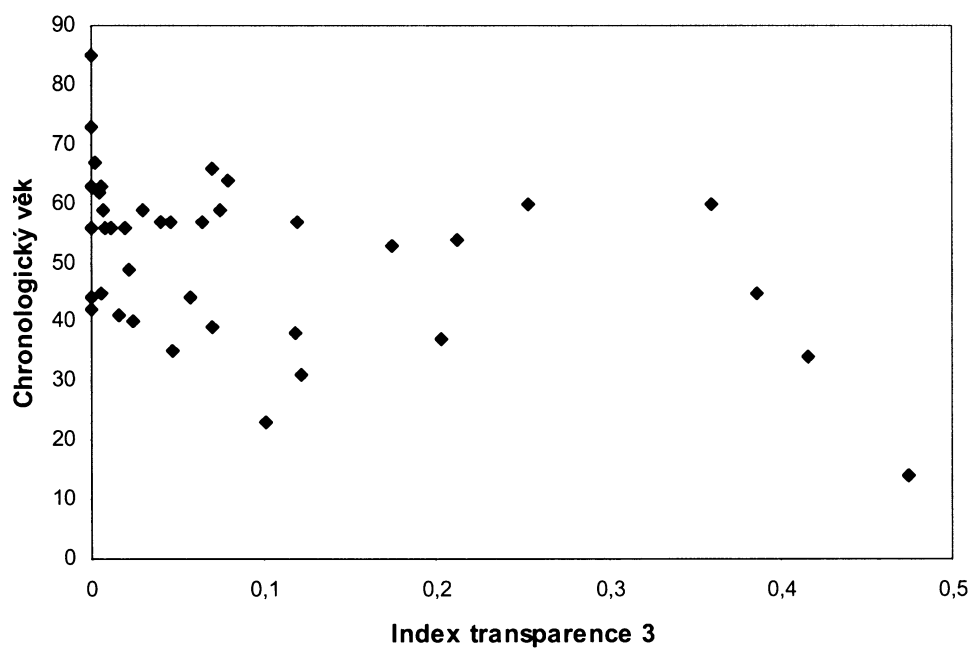
Model vysvětluje 24% variability logaritmu chronologického věku, jeho p-hodnota je 0,001285 a Pearsonův korelační koeficient  $r = 0,49$ .



Graf 6 Závislost logaritmu věku na Indexu transparence 3



Graf 7 Závislost chronologického věku na Indexu transparence 3



## 7.2 VÍCENÁSOBNÁ LINEÁRNÍ REGRESE PRO CHRONOLOGICKÝ VĚK

Výsledky získané při použití všech třech indexů transparence najednou jsou zapsány v následující tabulce.

Tab. 9 Model 4 - výsledky vícenásobné lineární regrese

	$b_0$	$b_1$	$b_2$	$b_3$	$r^2$	$r$
	4,05772	-1,11347	-0,85013	-0,11559	0,47481818	0,68907052
p-hodnota		0,13080	0,145594	0,814365		

Tento souhrnný model popisuje rovnice

$$\text{Ln věk} = 4,05772 - 1,11347 * x_1 - 0,85013 * x_2 - 0,11559 * x_3$$

Hodnota Pearsonova korelačního koeficientu je 0,69, celková p-hodnota modelu je 0,00006 a model vysvětluje 47,5% variability závisle proměnné. Tento model vysvětluje největší podíl variability, ale na 5% hladině spolehlivosti je v něm významný pouze Index transparence 1 (po vynechání Indexu transparence 2 a 3 z modelu klesne příslušná p-hodnota pod hladinu významnosti 0,05).

## 7.3 SPEARMANŮV KORELAČNÍ KOEFICIENT PRO CHRONOLOGICKÝ VĚK

Na základě zjištění, že žádná proměnná nemá normální rozdělení byl ještě počítán Spearmanův koeficient reliability. Získané výsledky uvádí následující tabulka.

Tab. 10 Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu

	Index transparence 1	Index transparence 2	Index transparence 3
Ln věk	-0,468410	-0,293786	-0,418688

Modrou barvou jsou uvedeny výsledky, jež jsou významné na 10% hladině významnosti. Zelenou barvou pak výsledky významné na 5% hladině významnosti.

Na základě těchto výsledků můžeme říct, že závislost je významná pro Index transparency 1 a 3 na 5% hladině významnosti a pro Index transparency 2 na 10% hladině významnosti. Jelikož závislost byla prokázána i tímto způsobem, dá se předpokládat, že lineární modely odhadly závislost správně.

## 7.4 JEDNODUCHÁ LINEÁRNÍ REGRESE PRO KORIGOVANÝ VĚK

Výsledky získané s použitím korigovaného věku a jednotlivých indexů uvádí následující tabulka. Na základě jednotlivých měření byly vytvořeny modely pro každý index transparency zvlášť jako v případě chronologického věku.

Tab. 11 Získané modely jednoduché lineární regrese pro korigovaný věk

	$b_0$	$b_1$	$r^2$	$r$	p-hodnota
Model 5	3,85788	-3,50001	0,48018693	0,69295521	0,000000
Model 6	3,97300	-2,86425	0,334102190	0,57801574	0,000032
Model 7	3,88713	-2,56771	0,30825752	0,55520943	0,000200

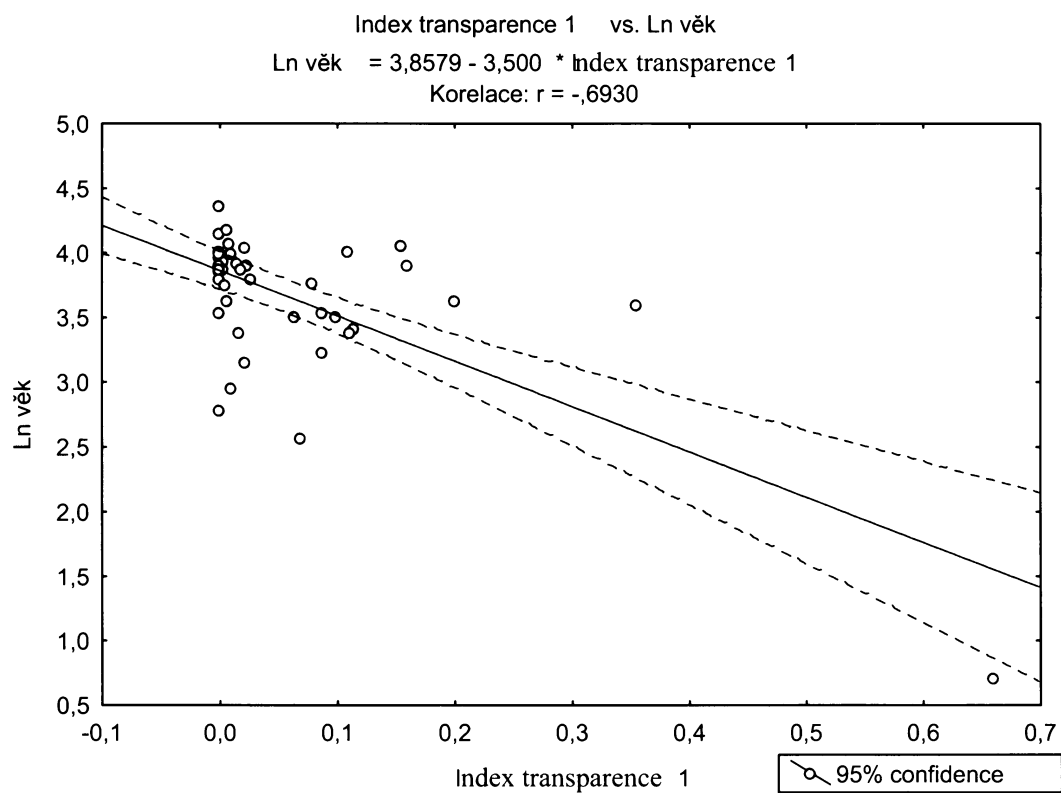
### 7.4.1 MODEL 5

Na základě těchto výsledků je možné model 5 zapsat jako:

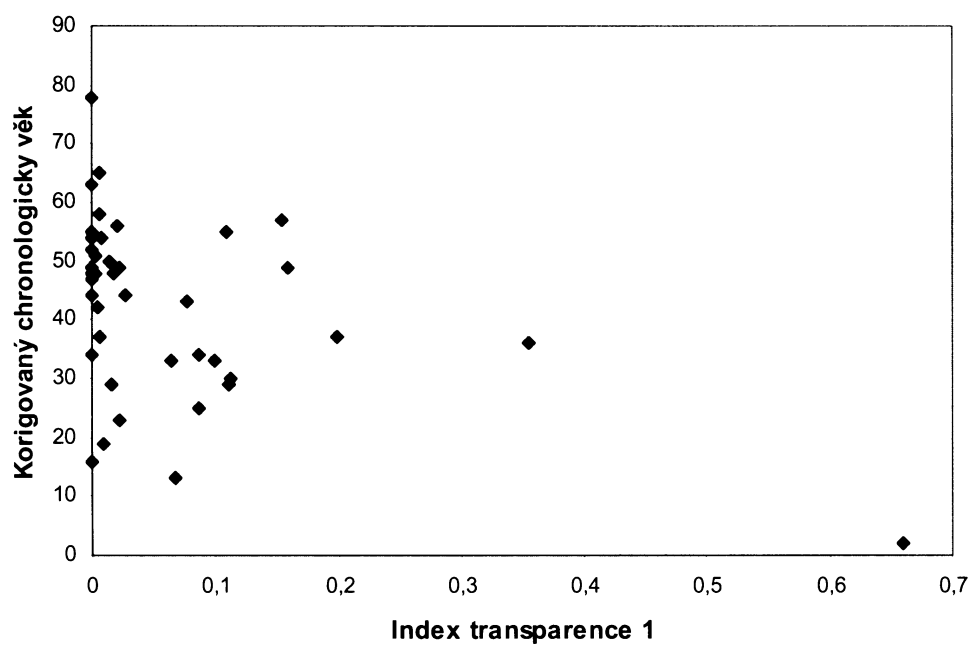
$$\text{Ln věk} = 3,85788 - 3,50001 * \text{index transparency 1}$$

Tento model vysvětluje 48% variability závisle proměnné (logaritmu korigovaného chronologického věku) a závislost byla prokázána na 5% hladině významnosti ( $p = 0,00$ ). Hodnota Pearsonova korelačního koeficientu je 0,69.

Graf 8 Závislost logaritmu korigovaného věku na Indexu transparence 1



Graf 9 Závislost korigovaného chronologického věku na Indexu transparence 1



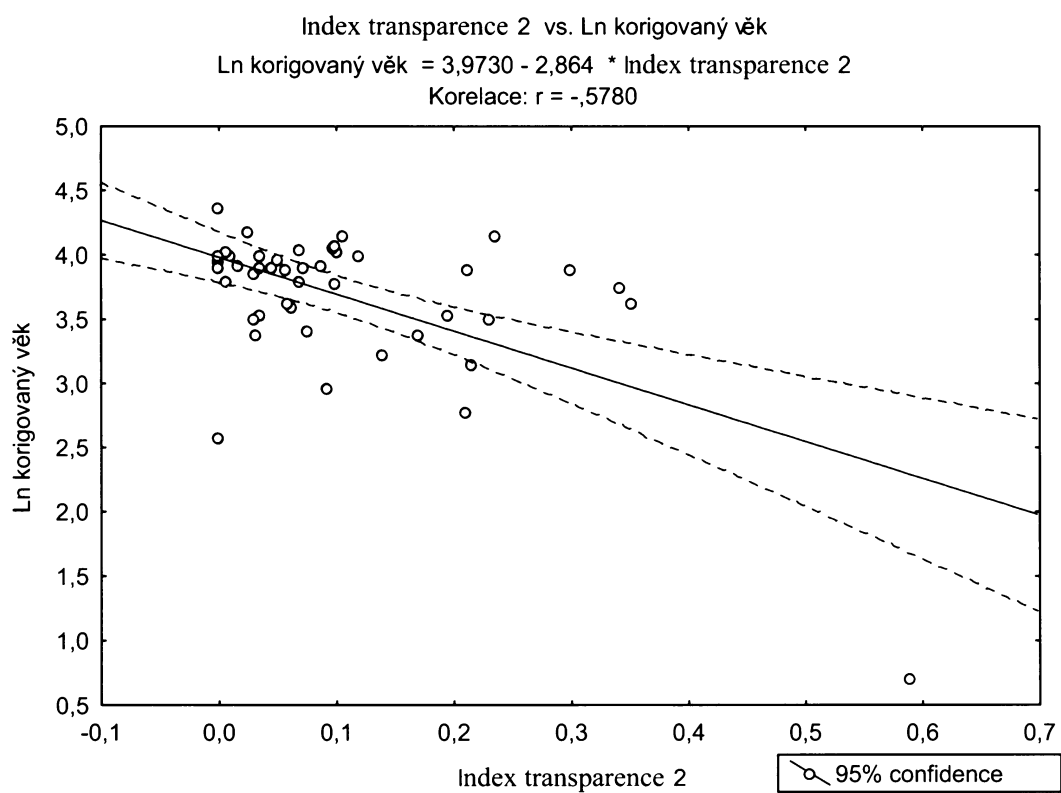
## 7.4.2 MODEL 6

Tento model charakterizuje následující rovnici:

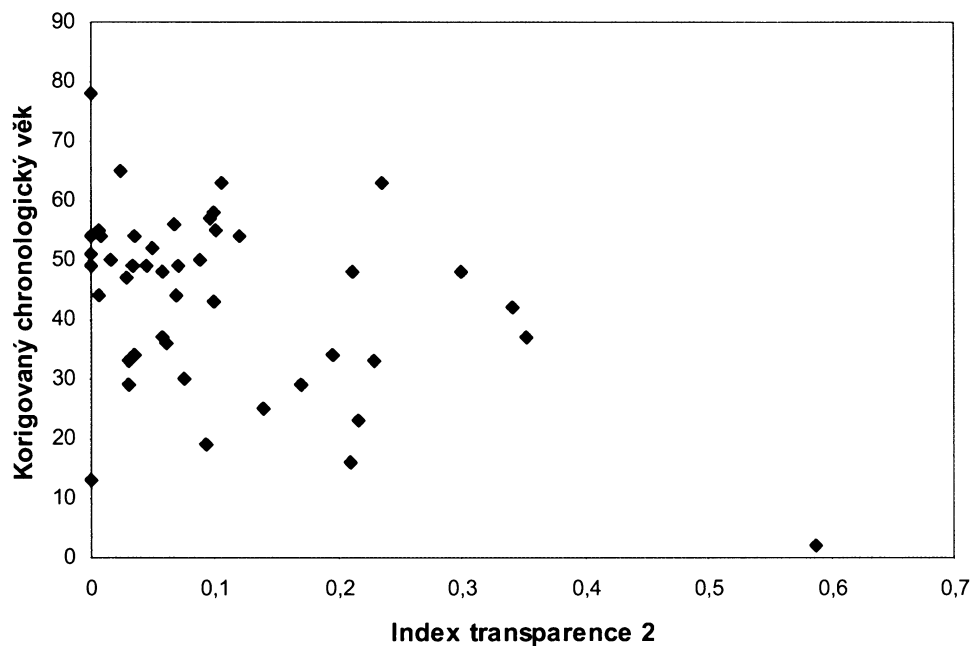
$$\text{Ln věk} = 3,973 - 2,86425 * \text{index transparence 2}$$

Model vysvětluje 33% variability logaritmu korigovaného chronologického věku a na 5% hladině významnosti potvrzuje závislost mezi proměnnými ( $p = 0,000032$ ). Pearsonův korelační koeficient dosahuje hodnoty 0,57.

Graf 10 Závislost logaritmu korigovaného věku na Indexu transparence 2



Graf 11 Závislost korigovaného chronologického věku na Indexu transparence 2



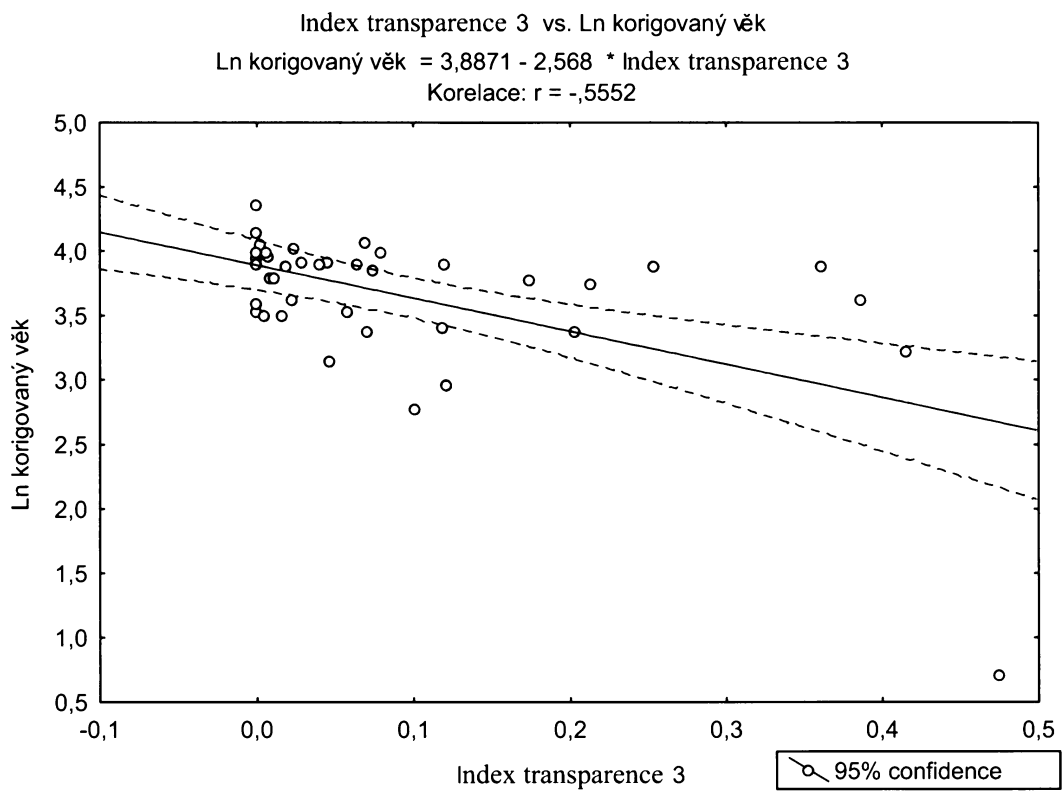
### 7.4.3 MODEL 7

Model 7 je představován rovnicí:

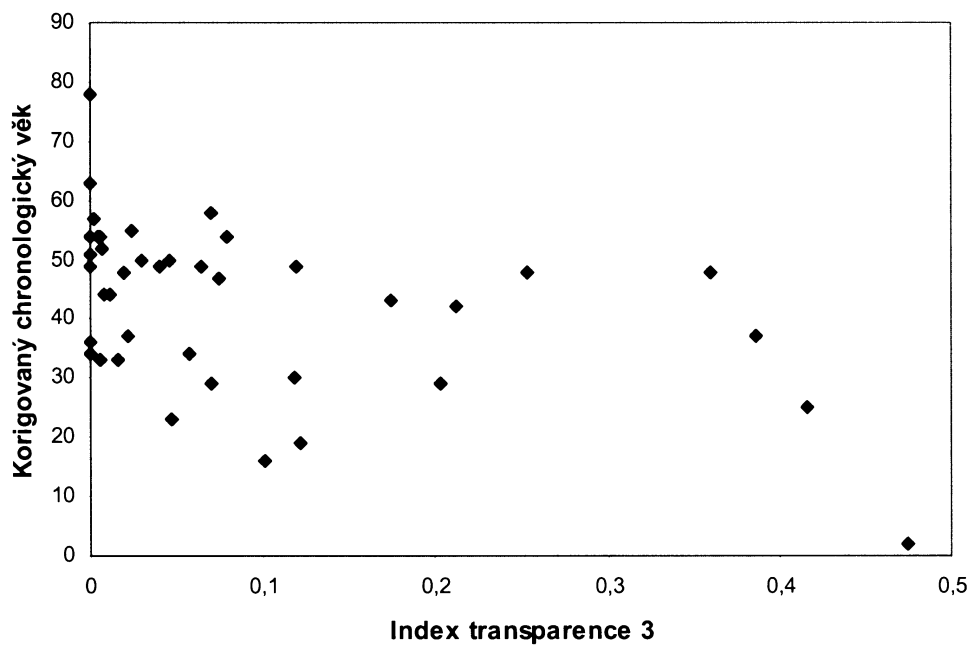
$$\text{Ln věk} = 3,88713 - 2,56771 * \text{index transparence 3}$$

Model vysvětluje 30% variability logaritmu korigovaného chronologického věku, jeho p-hodnota je 0,0002 a Pearsonův korelační koeficient dosahuje hodnoty 0,55.

Graf 12 Závislost logaritmu korigovaného věku na Indexu transparence 3



Graf 13 Závislost chronologického korigovaného věku na Indexu transparence 3



## 7.5 VÍCENÁSOBNÁ LINEÁRNÍ REGRESE PRO KORIGOVANÝ VĚK

Výsledky získané při použití všech třech indexů transparency najednou a hodnot korigovaného věku jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 12 Model 8 - výsledky vícenásobné lineární regrese pro korigovaný věk

	$b_0$	$b_1$	$b_2$	$b_3$	$r^2$	$r$
	3,98091	-2,40423	-1,4875	-0,34996	0,61943277	0,78704052
p-hodnota		0,000698	0,0,94750	0,639618		

Tento souhrnný model popisuje rovnice

$$\text{Ln věk} = 3,98091 - 2,40423 * x_1 - 1,4875 * x_2 - 0,34996 * x_3$$

Hodnota Pearsonova korelačního koeficientu je v tomto případě 0,78, celková p-hodnota modelu je 0,000000 a model vysvětluje 61,9% variability závisle proměnné. Tento model pro korigovaný věk vysvětluje největší podíl variability, ale na 5% hladině spolehlivosti je v něm významný pouze Index transparency 1 (po vynechání Indexu transparency 2 a 3 z modelu klesne příslušná p-hodnota pod hladinu významnosti 0,05).

## 7.6 SPEARMANŮV KORELAČNÍ KOEFICIENT PRO KORIGOVANÝ VĚK

Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu pro závislost jednotlivých indexů transparency a korigovaného věku jsou uvedeny v tabulce 10.

Tab. 13 Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu pro korigovaný věk

	Index transparency 1	Index transparency 2	Index transparency 3
Ln věk	-0,402158	-0,290220	-0,487615

Modrou barvou jsou uvedeny výsledky, jež nejsou významné na 5% ani 10% hladině významnosti. Zelenou barvou pak jsou uvedeny výsledky významné na 5% hladině



významnosti.

Na základě těchto výsledků můžeme říct, že závislost je významná pro Index transparence 1 a 3 na 5% hladině významnosti a pro Index transparence 2 hladina nebyla prokázána. Aby byla prokázána závislost i u tohoto Indexu transparence 2 bylo by zřejmě potřeba většího množství výsledků.

## **7.7 VÝSLEDEK MĚŘENÍ ABSORBANCE DAB**

Při přidání jednotlivých látek potřebných k dekalifikaci do roztoku DAB nesmí docházet k rozpouštění sraženiny, aby byla látka vhodná pro sledovaný účel, tedy barvení dentinových tubulů. Pokud by docházelo k rozpouštění sraženiny vlivem některé použité chemikálie, byla by barva uvolňována do supernatantu a ten by měl vyšší hodnoty absorbance v dané vlnové délce.

Ke všem vzorkům, které obsahovaly supernatant a sraženinu byly postupně přidány všechny chemické látky nutné pro dekalifikaci tvrdých zubních tkání. Každé měření proběhlo dvakrát a to vždy na dvojici vzorků.

Nejprve byl přidáván 10% vodný roztok EDTA Na<sub>2</sub> (Chelaton III). Směs byla řádně promíchána a poté byla měřena absorbance supernatantu. Oproti původní absorbanci supernatantu nedošlo k jejímu zvýšení při vlnové délce 465 nm oproti referenčním hodnotám absorbance použité chemikálie. V dalších krocích byl stejným postupem přidán xylen a 96% ethanol. Ani u těchto vzorků při spektrofotometrickém měření nebyl zaznamenán signifikantní nárůst absorbance oproti referenčním hodnotám. Z toho vyplývá, že ani tyto látky sraženinu DAB nerozpouštějí.

Na základě těchto zjištění se DAB jeví jako vhodná látka pro barvení dentinových tubulů. Výsledný barevný produkt reakce zůstává stabilním i při následné dekalifikaci tvrdých zubních tkání.

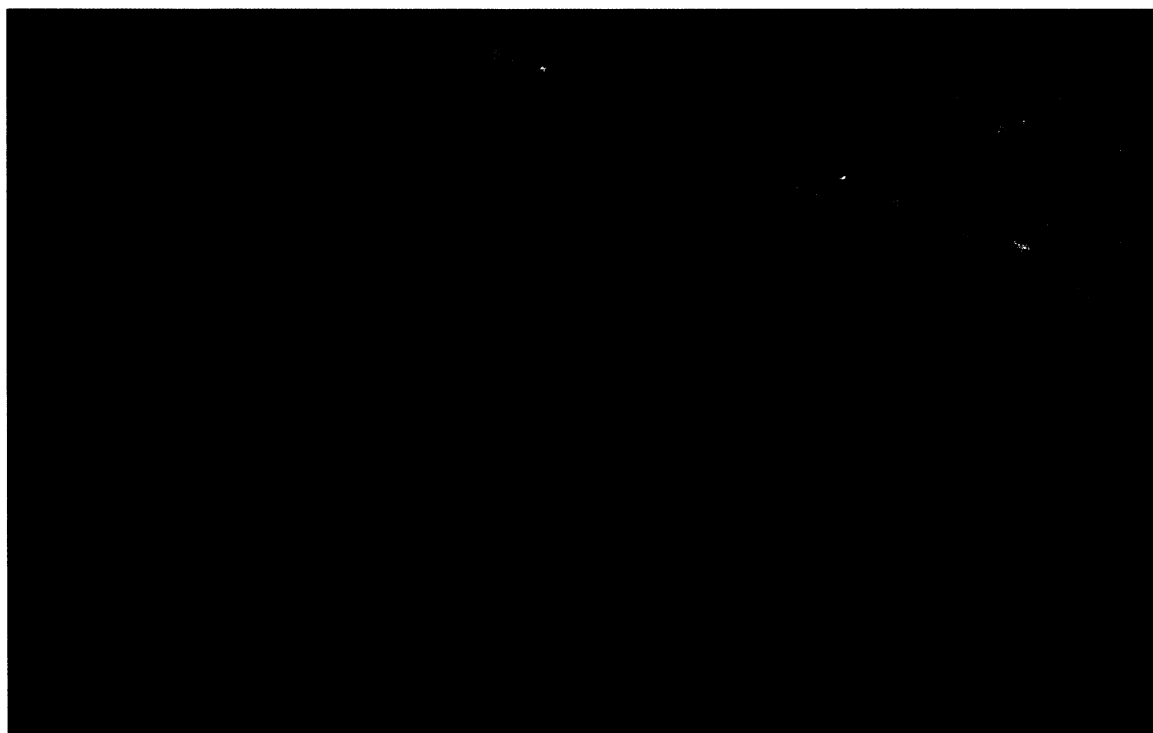
## **7.8 CHYBA MĚŘENÍ**

Chyba měření byla počítána ze dvou měření celého souboru. Mezi oběma měřeními byl větší časový rozestup. Koeficienty reliability získané z těchto měření jsou uvedeny v následující tabulce.

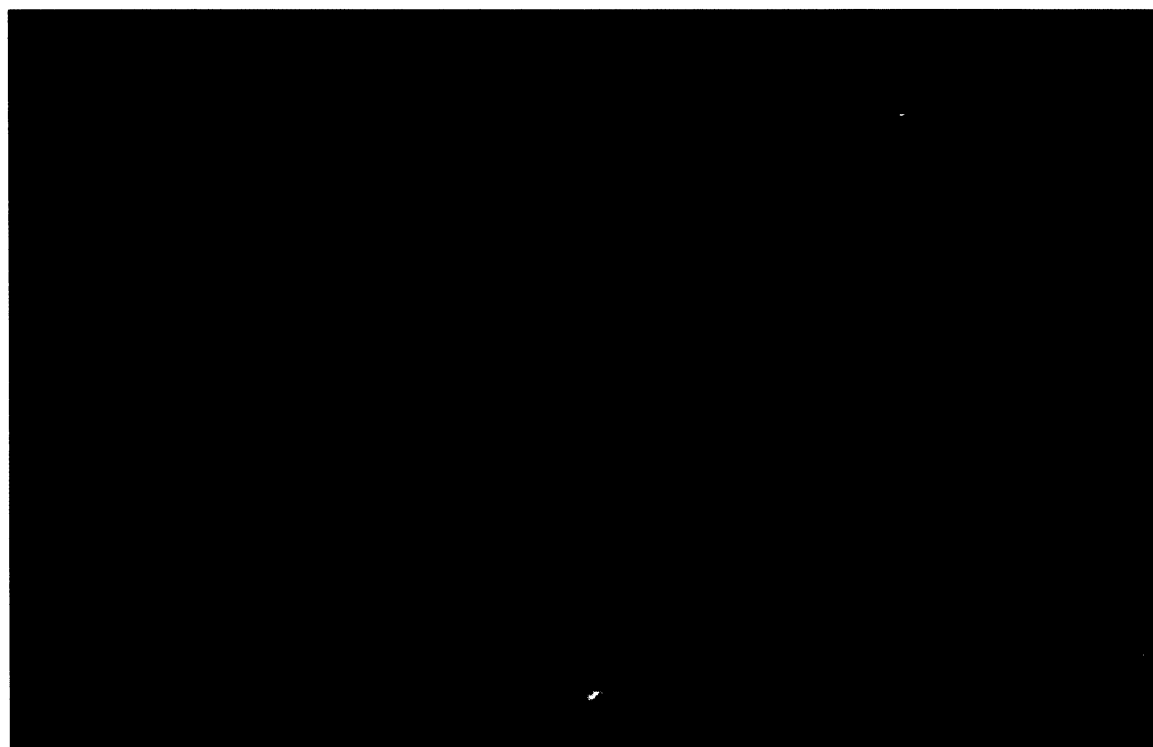
Tab. 14 Přehled hodnot intraindividuální a interindividuální chyby

	Koeficient reliability R pro Index transparence 1	Koeficient reliability R pro Index transparence 2	Koeficient reliability R pro Index transparence 3
Intraindividuální chyba	0,99	0,99	0,99
Interindividuální chyba	0,99	0,99	0,99

Obr.11 Fotografie nedekalcifikovaného řezu středem kořene vzorek S12 (Index transparence 2), barveno toluidinovou modří, zvětšeno 20x



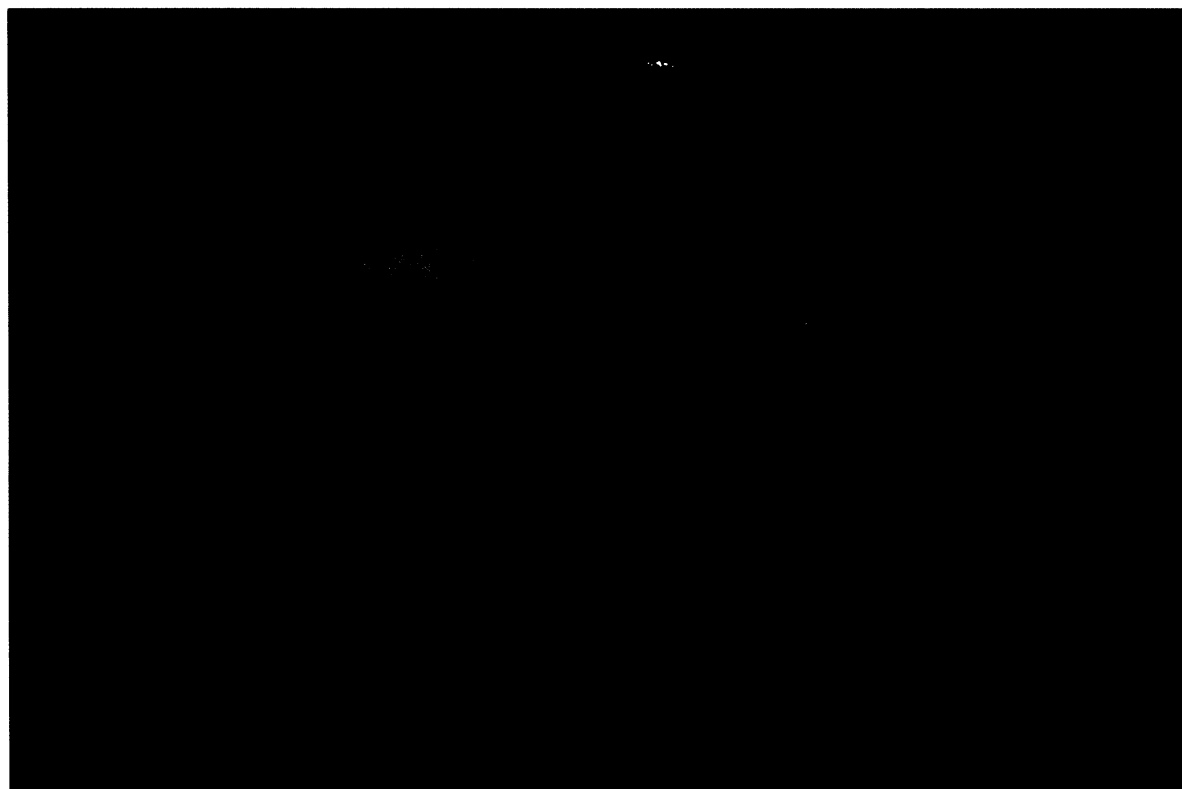
Obr.12 Fotografie nedekalcifikovaného řezu v první čtvrtině kořene vzorek 6 (Index transparence 1), barveno toluidinovou modří, zvětšeno 20x



Obr.13 Fotografie nedekalcifikovaného řezu v třetí čtvrtině kořene vzorek 11b (Index transparence 3), barveno toluidinovou modří, zvětšeno 20x



Obr.14 Fotografie nedekalcifikovaného řezu v první čtvrtině kořene vzorek 1 (Index transparence 1), barveno toluidinovou modří, zvětšeno 20x



## 8. DISKUSE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo prověření možnosti aplikace vyhodnocování sklerotizace dentinových tubulů kořenového dentinu při odhadu chronologického věku podle uzavírání dentinových tubulů. Sklerotizace tubulů je v přímé souvislosti s transparentí, ale není to zcela totožný jev. Protože transparence kořenového dentinu byla již zkoumána řadou autorů, bylo v tomto případě zvoleno mikroskopické sledování sklerotizace dentinových tubulů. To znamená jev, na jehož základě transparence kořenového dentinu, jakožto jeho makroskopický projev, vzniká. V rámci této práce se podařilo definovat jednotlivé kroky metodiky a ověřit jejich použitelnost.

Jedním z požadavků na aplikovaný metodický postup bylo, aby byl pokud možno technicky, časově a finančně nenáročný. Tedy taková metodika, s jejíž pomocí by bylo možné provádět odhady věku s co možná nejvyšší časovou a finanční efektivitou. Vzniklá metodika je poměrně nenáročná z finančního i časového hlediska. Celá procedura od získání zubu po vyhodnocení fotografií se dá v případě výbrusu zvládnout během několika dní. Z dosažených výsledků první fáze studie je zřejmé, že rozsah sklerotizace kořenového dentinu, v souladu s primárními předpoklady, vykazuje vysokou míru korelace k chronologickému věku jedince. Na základě získaných výsledků a statistického vyhodnocení bylo zjištěno, že mezi chronologickým věkem a uzavíráním dentinových tubulů je závislost. Použitím této metody byla závislost mezi chronologickým věkem a sklerotizací dentinových tubulů prokázána na 5% hladině významnosti.

Za pozitivum metody považujeme získání vysokých hodnot koeficientů reliability. Způsob vyhodnocování dat se tedy jeví jako vhodný, přestože by jistě bylo možné ho ještě vylepšit. Další možností v tomto směru by bylo automatické počítačové vyhodnocení pomocí vhodného softwaru. Proces by se tak mohl zpřesnit a pravděpodobně také zrychlit. Otázkou zůstává, zda by naopak převádění fotografií do černobílého formátu a jejich následné vyhodnocování pomocí softwaru nevnese do procesu další chyby. Po převedení do černobílého formátu by bylo ještě nutné provést manuální korekci, tedy vymezení pozitivní a negativní plochy. Právě tato fáze by mohla způsobit vnesení větší chyby, než k jaké dochází při ručním značení obarvené plochy.

Získané výsledky korelačních koeficientů můžeme porovnat s pracemi jiných autorů zabývajících se podobnými tématy. Hodnoty vybraných korelačních koeficientů jsou uvedeny v následující tabulce č. 15.

Tab.15 Přehled korelačních koeficientů vybraných prací (Hillson 1996)

Část kostry nebo jev sledovaný v metodice	Pearsonův korelační koeficient	Autor (rok publikace)
Sutury lebky	<b>0,53</b>	Lovejoy et al. (1985)
Transparence kořenového dentinu	<b>0,87</b>	Vasiliadis et al. (1983a)
Počet cementových linií	<b>0,78</b>	Condon et al. (1986)
Transparence kořenového dentinu	<b>0,67</b>	Miles (1978)
Sekundární dentin dle Johansona	<b>0,59 – 0,74</b>	Solheim (1992)
Sekundární dentin	<b>-0,46 – 0,77</b>	Solheim (1992)
Tloušťka cementu	<b>0,31 – 0,72</b>	Solheim (1990)

Hodnoty korelačních koeficientů dosažené v této studii se pohybují od hodnoty 0,49 do hodnoty 0,58 pro jednotlivé řezy a pro model kombinující řezy ze všech částí kořene je hodnota korelačního koeficientu 0,69. Celkově tedy můžeme říct, že získané výsledky by se řadili zhruba do středu této tabulky a jsou tedy srovnatelné s výsledky prací zabývajících se obdobnou tematikou.

Jedním z výsledků této práce bylo zjištění, že lepších výsledků je možno dosáhnout pokud je použit korigovaný věk namísto chronologického věku. Tedy pouze doba od dokončení vývoje zubu nikoli celkový chronologický věk jedince.

Na hodnoty korelačního koeficientu a koeficientu determinance má zřejmě největší vliv tloušťka řezu. Za předpokladu, že by se podařilo řezy ztenčit, lze s vysokou pravděpodobností předpokládat zvýšení přesnosti následného odhadu. Ideálním řešením by bylo použití odvápněných kořenů. Na dekalifikované tkáni by bylo možné získat série řezů v definovaných oblastech, z ¼, ½ a ¾ délky kořene. V každé oblasti by bylo možné

získat například 10 řezů o tloušťce 10 - 15  $\mu\text{m}$ , z nichž by se mohly použít průměrné hodnoty. Takto standardizované měření by pravděpodobně dosáhlo vyšších hodnot koeficientu determinance a korelačního koeficientu

Použití dekalcifikace je sice jedním z možných zlepšení, ale současně je nutné si uvědomit, že takový postup prodlouží určení věku z několika dnů na několik týdnů, nebo dokonce měsíců, vzhledem k nutnosti poměrně časově náročné dekalcifikace zubu. Při použití dekalcifikace je nutné zvolit vhodný barvicí systém pro zviditelnění propustných dentinových kanálů. Ten musí splňovat následující podmínky. V průběhu dekalcifikace, následného zalévání a deparafinace řezu nesmí docházet k vymývání aplikované látky z tkáně. Barva rovněž nesmí tkáňovým bločkem volně difundovat. Z tohoto důvodu se jako nejvhodnější pro daný účel jevila aplikace některé z histochemických barvicích technik, jejichž výsledný barevný produkt je tvořen nerozpustnou sraženinou. Sraženina se nesmí rozpouštět vlivem žádného následně aplikovaného činidla. V rámci této práce byl laboratorně testován DAB - 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochlorid, jehož oxidací vzniká hnědá nerozpustná sraženina. Na základě výsledků získaných spektrofotometrickým stanovením lze tuto látku doporučit.

Ve snaze o co nejjednodušší barvení dentinových kanálů bylo zkoušeno podtlakové barvení zubu, které vykazuje výrazně vyšší míru standardizace. V rámci této metody byl zub vložen do zkumavky s barvou. Ve zkumavce bylo takové množství barvy, aby byl zub zcela ponořený. Zkumavka byla následně umístěna do nádoby, která byla připojena na vývěvu. Z nádoby a tedy i ze zkumavky byl postupně odsáván vzduch. Při poklesu tlaku pod určitou hranici bylo patrné, že se uvolňuje vzduch, který byl uvnitř zubu. Po odsátí tohoto vzduchu byl postupně zvyšován tlak v nádobě a do zubu se tak místo vzduchu nasála barva. Po vytvoření výbrusů z takového zubu bylo patrné, že došlo k obarvení dentinových tubulů tak, jako v případě použití tenké jehly. Tímto způsobem by bylo možné barvit i větší množství zubů najednou. Vzhledem k tomu, že tato metoda byla testována až v průběhu této práce nebyla již standardně využita z důvodu zachování jednotné metodiky, ale je jednou z možností, jak zuby barvit. Tato metoda může být v budoucnu ověřena a případně používána jako metoda standardního barvení dentinových tubulů.

## 9. ZÁVĚR

Hlavním sledovaným cílem této diplomové práce bylo definovat vhodný metodický postup pro odhad chronologického věku s využitím hodnocení míry sklerotizace dentinových tubulů. Za tímto účelem byl zpracován soubor celkem 46 extrahovaných lidských zubů permanentní dentice. Každý zub pocházel od jiného jedince a vždy se jednalo o jednokořenné zuby. Jedinci od nichž zuby pocházely byly ve věku od 14 do 85 let.

Zuby byly pro hodnocení použity nedemineralizované. Z kořenné části zubu byly zhotovovány výbrusy o tloušťce 0,5 mm. Dřeňová dutina spolu s dentinovými tubuly každého zubu byla obarvena pomocí tenké jehly přes foramen apicis dentis. K barvení byla použita toluidinová modř. Z každého zubu, pokud to bylo možné, vznikly tři výbrusy ze tří oblastí kořene (1/4, 1/2 a 3/4 délky kořene). Použitá metoda je založena na zjištění poměru mezi plochou dentinu s otevřenými dentinovými tubuly a celkovou plochou dentinu, tedy zjištění indexu transparence. Plochy dentinu byly měřeny pomocí počítačového programu tps dig.

Výsledky měření jsou vyhodnoceny pomocí lineární regrese. Byla zjištěna závislost mezi logaritmem chronologického věku a indexem transparence dentinu u všech tří oblastí kořene, ze kterých byly výbrusy zhotovovány, na 5 % resp. 10 % hladině významnosti. Byly vytvořeny modely pro každou oblast kořene a chronologický věk zvlášť a poté i pro všechny tři oblasti a chronologický věk dohromady. Následně byly podobné modely vytvořeny s použitím korekce chronologického věku podle typu zubu. I v tomto případě byla zkoumána závislost tohoto věku a všech tří indexů transparence zvlášť a poté všech indexů transparence dohromady. Také zde byly formulovány příslušné modely.

Nejvíce variability vysvětlily modely využívající všech tří indexů transparence najednou, ale i v tomto modelu přispívají indexy transparence z 1/2 a 3/4 délky kořene k vysvětlení celkové variability poměrně málo. Pokud použijeme model s použitím pouze jednoho z indexů, pak jsou nejvhodnější modely používající index transparence 1, tedy z 1/4 délky kořene.

Pro účely ověření možnosti využití histochemického barvení pro barvení dentinových tubulů dekalifikovaných zubů byl hledán vhodný barvicí systém. Mezi základní požadavky na tuto látku patřilo to, aby vytvářela nerozpustnou sraženinu, aby se



tato sraženina nerozpouštěla při následném procesu dekalifikace tvrdých zubních tkání a aby měla látka vhodnou kontrastní barvu ve vztahu k přirozenému zabarvení tkání, kterou bude možno následně pozorovat na řezech kořenem. Bylo vybíráno z látek, které byly ověřené z praxe v naší laboratoři a kde se také běžně používají. Nakonec byl jako barvicí látka vybrán 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochlorid (DAB). Tato látka byla laboratorně testována a bylo zjištěno, že při kontaktu s látkami nutnými pro dekalifikaci se sraženina této látky nerozpouští. Na základě tohoto zjištění se tato látka jeví jako vhodná pro barvenou vizualizaci nesklerotizovaných dentinových tubulů u zubů určených k dekalifikaci.

## 10. SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKALIÍ

ACETON, P.A. – p.lab, katalogové číslo A01101

CHLORID DRASELNÝ – p-lab, katalogové číslo Q 04101

CHLORID SODNÝ – p-lab, katalogové číslo Q 09101

DAB - 3,3'- diaminobenzidine tetrahydrochlorid – Sigma.Aldrich, USA

DENTACRYL TECHNICKÝ – SpofaDental, katalogové číslo 1311188-1

DIHYDROGENFOSFOREČNAN VÁPENATÝ – p-lab, katalogové číslo D02101

DODEKAHYDRÁT HYDROGENFOSFOREČNAN SODNÝ – p-lab, katalogové číslo H08102

EDTA Na<sub>2</sub> (CHELATON III), p.a. min 99 % - p-lab, katalogové číslo R 80432

ETHYLALKOHOL, čistý 96 % - p-lab, katalogové číslo E 02301

FORMALDEHYD, pro histologii, bez kyselin, min 37% - p-lab, katalogové číslo R 67335

KYSELINA FOSFOREČNÁ– p-lab, katalogové číslo K 08101

TOLUIDINOVÁ MODŘ, pro mikroskopii – p-lab, katalogové číslo R 03002

XYLEN, p.a. – p-lab, katalogové číslo X 01101

## 11. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Diagram sagitálního řezu řezákem zasazeným v kosti dolní čelisti. Převzato z Junqueira 1997 – str.13

Obr. 2 Peritubulární dentin.(Hillson 1996) – str. 17

Obr. 3 Odontoblasty (Stevens 2005) – str.18

Obr. 4 Dentinové tubuly (Stevens 2005) – str. 19

Obr. 5 Schématické nákresy vývoje řezáku – sagitální řez (Moore 2002) – str. 27

Obr. 6 Fotografie vznikajícího dentinu (Stevens 2005) – str. 28

Obr. 7 Fotografie vznikající skloviny produkované vrstvou ameloblastů (Stevens 2005) – str. 29

Obr. 8 Involuční změny na výbrusech frontálních zubů podle Kiliána (Kilián 1981) – str. 38

Obr. 9 Bodové hodnocení involučních změn sledovaných na výbrusech frontálních zubů podle Kiliána (Kilián 1981) – str. 39

Obr.10 Obarvené řezy zubů s různým stupněm prostupnosti dentinových tubulů (Paqué 2006) – str. 46

Obr.11 Fotografie nedekalcifikovaného řezu středem kořene vzorek S12 (Index transparence 2), barveno toluidinovou modří, 20x zvětšeno – str. 74

Obr.12 Fotografie nedekalcifikovaného řezu v první čtvrtině kořene vzorek 6 (Index transparence 1), barveno toluidinovou modří, 20x zvětšeno – str. 74

Obr.13 Fotografie nedekalcifikovaného řezu v třetí čtvrtině kořene vzorek 11b (Index transparence 3), barveno toluidinovou modří, 20x zvětšeno – str. 75

Obr.14 Fotografie nedekalcifikovaného řezu v první čtvrtině kořene vzorek 1 (Index transparence 1), barveno toluidinovou modří, 20x zvětšeno – str. 75

## 12. SEZNAM TABULEK A GRAFŮ

- Tab. 1 Věk prořezání dočasných zubů – str. 31
- Tab. 2 Doba vypadávání dočasných zubů – str. 32
- Tab. 3 Věk prořezání trvalé dentice – str. 33
- Tab. 4 Zastoupení jednotlivých typů zubů v souboru, rozdělení podle pohlaví – str. 47
- Tab. 5 Přehled všech zubů zařazených do souboru (typ zubu, pohlaví, věk) – str. 48
- Tab. 6 Přehled odvodňování roztokem etanolu – str. 53
- Tab. 7 Přehled výsledků – str. 58
- Tab. 8 Získané modely jednoduché lineární regrese – str. 60
- Tab. 9 Model 4 - výsledky vícenásobné lineární regrese – str. 65
- Tab. 10 Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu – str. 65
- Tab. 11 Získané modely jednoduché lineární regrese pro korigovaný věk – str. 66
- Tab. 12 Model 8 - výsledky vícenásobné lineární regrese pro korigovaný věk – str. 71
- Tab. 13 Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu pro korigovaný věk – str. 71
- Tab. 14 Přehled hodnot intraindividuální a interindividuální chyby – str. 73
- Tab. 15 Přehled korelačních koeficientů vybraných prací – str. 77
- 
- Graf 1. Četnost zubů ve skupinách podle typu zubu a pohlaví – str. 47
- Graf 2 Závislost logaritmu věku na Indexu transparence 1 – str. 61
- Graf 3 Závislost chronologického věku na Indexu transparence 1 – str. 61
- Graf 4 Závislost logaritmu věku na Indexu transparence 2 – str. 62
- Graf 5 Závislost chronologického věku na Indexu transparence 2 – str. 63
- Graf 6 Závislost logaritmu věku na Indexu transparence 3 – str. 64
- Graf 7 Závislost chronologického věku na Indexu transparence 3 – str. 64
- Graf 8 Závislost logaritmu korigovaného věku na Indexu transparence 1 – str. 67
- Graf 9 Závislost korigovaného chronologického věku na Indexu transparence 1 – str. 67
- Graf 10 Závislost logaritmu korigovaného věku na Indexu transparence 2 – str. 68
- Graf 11 Závislost korigovaného chronologického věku na Indexu transparence 2 – str. 69
- Graf 12 Závislost logaritmu korigovaného věku na Indexu transparence 3 – str. 70
- Graf 13 Závislost chronologického korigovaného věku na Indexu transparence 3 – str. 70

### 13. POUŽITÁ LITERATURA:

- Azaz B. a kol (1986): The effect of aging on tooth morphology: a study on impacted teeth, *Oral-Surg-oral-med-oral-pathol*, Jan;61(1):54-60,
- Azaz B. a kol (1977): Aging of tissues of the roots of nonfunctional human teeth, *Oral-Surg-oral-med-oral-pathol*, Apr;43(4):572-8
- Balooch M., Demos S. G., Kinney J. H., Marshall G. W., Balooch G., Marshall S. J (2001): Local mechanical and optical properties of normal and transparent root dentine. *Journal of material science: Materials in medicine* 12 507-514
- Branko E. (1997): Metamorphosis of root dentine and age. *International journal of Osteoarcheology*, Vol. 7, 230-234.
- Čihák R. (2002): *Anatomie 2*, Grada Publishing, Praha.
- Drusini A.G., Volpa A., Dovigo S. (1990): Age determination in human adults by dental histology, *Zeitschrift für Morphologie und Anthropologie*;78(2):169-74.
- Drusini A. G., (1991): Age-related changes in root transparency of teeth in males and females. *American journal of human biology*3:629-637
- Drusini A. G. (1993): Age estimation from teeth using soft X-ray findings. *Anthropol-Anz.* Mar; 51(1): 41-6.
- Drusini et al (1997): The coronal pulp cavity index: A biomarker for age determination in human adults. *AJPA*,1997; 103(3):353-363
- Dylevský I., Druga R., Mrázková O.: *Funkční anatomie člověka*. 2000 Grada publishing, Praha
- Fahimi H.D., Herzog V. (1973): A colorimetric method for measurement of the (peroxidase-mediated) oxidation of 3,3'-diaminobenzidine. *The journal of histochemistry and cytochemistry*, 21(5):499-503
- Hillson S. (1996): *Dental anthropology*. University Press, Cambridge.
- Junqueira J. C., Carneiro J., Kelley R. O. (1997): *Základy histologie*. 7. vyd. Nakladatelství a vydavatelství H&H, Jinočany
- Kilián J., Šídlo R., Merglová V.: K problematice určování stáří jedince podle chrupu, *Soudní lékařství* 26 (3): 33-42, 26 (4): 49-59, 1981
- Konrádová V., Uhlík J., Vajner L.: *Funkční histologie*. 2000, 2. vydání, H&H, Jinočany

- Kvaal S. I., Kolltveit K. M., Thomsen I. O., Solheim T.(1995): Age estimation of adults from dental radiographs. *Forensic Science International* , Volume 74 , Issue 3, Pages 175 - 185
- Lackovic KP, Wood RE (2000):Tooth root colour as a measure of chronological age. *J Forensic Odontostomatol.* Dec;18(2):37-45
- Luna H. L. (2006),: Evaluation of uniradicular teeth for age-at-death estimations in a sample from a Pampean hunter-gatherer cemetery (Argentina). *Journal of Archeological Science*, , Dec, 33(12): 1706-1717
- Mazurová Y. (2004): Obecná stavba zubu, materiály k přednášce. [www.lfhk.cuni.cz/histologie](http://www.lfhk.cuni.cz/histologie)
- Micheletti C. M., (1998): Dental histology: study of aging processes in root dentine. *Bollettino della Società italiana di biologia sperimentale.* Mar-Apr, 74(3-4):19-28
- Moore K. L., Persaud T.V. N. (2002): Zrození člověka. *Embryologie s klinickým zaměřením.* ISV nakladatelství, Praha
- Paqué F., Luder H. U., Sener B., Zehnder M . (2006): Tubular sclerosis rather than smear layer impedes dye penetration into the dentine of endodontically instrumented root canals. *International Endodontic journal*, 39, 18-25
- Perlíková Š. (2006): Stav chrupu současné české populace. Diplomová práce, PřF UK, Praha
- Pilín A.( 1982): Možnosti určení věku podle zubů, *Soudní lékařství*, Jan;27(1):1-10
- Pilín A., Cabala R., Pudil F., Bencko V. (2001): The use of the D-, L- aspartic ratio in decalcified collagen from human dentin as an estimator of human age, *Journal of Forensic Science*, Sep;46(5):1228-31,
- Sajdok J., Pilín A., Pudil F., Zídková J., Káš J. (2006): A new method of age estimation based on the changes in human non-collagenous proteins from dentin, *Forensic Science International* 156;254-249
- Stevens A., Lowe J (2005).: *Human histology.* third edition, Elsevier Mosby
- Stloukal M., Dobisíková M., Kuželka V., Stránská P., Velemínský P., Vyháněk L., Zvára K. (1999): *Antropologie Příručka pro studium kostry.* Národní muzeum, Praha
- Šmahel Z. (2001): *Principy, teorie a metody auxologie,* Karolinum, Praha
- Taušnerová Š. (2007): Aposice cementu na povrchu kořene ve vztahu k chronologickému

věku jedince. Diplomová práce, PřF UK, Praha

tps dig : <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>

Vacek Z. (1988): Histologie a histologická technika. Avicenum, Praha

Vasiliadis L., Darling A. I., Levers B. G. H.: (1983) The amount and distribution of sclerotic human root dentine. Archives of oral biology, 28(7), 645-649

Wolf J. (1940): Mikroskopická technika. Vesmír nakladatelská a vydavatelská společnost s.r.o., Praha