

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

Aposice cementu na povrchu kořene zubu ve vztahu  
k chronologickému věku jedince

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Štěpánka Taušnerová

Praha 2007

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

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



Souhlasím, aby byla práce půjčována ke studijním účelům.

V Praze dne 20. srpna 2007

Na tomto místě bych ráda poděkovala především vedoucímu své diplomové práce RNDr. Patriku Mottlovi, Ph.D. za cenné podněty a připomínky. Dále patří mé poděkování také MUDr. Alexandru Pilinovi, CSc. za ochotné poskytnutí studijního materiálu.

## **OBSAH:**

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>6</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>9</b>
2.1. URČOVÁNÍ VĚKU PODLE CHRUPU.....	9
2.1.1 Morfologické změny zubů.....	9
2.1.1.1. Opotřebenění zubů (abraze).....	9
2.1.1.2. Atrofie zubních lůžek.....	11
2.1.1.3. Ztráta zubu.....	11
2.1.2. Histologické metody.....	11
2.2. HISTORIE METODY HODNOCENÍ CEMENTOVÝCH APOSIC.....	14
2.3. PŮVOD CEMENTOVÝCH APOSIČNÍCH LINIÍ.....	17
2.4. VÝVOJ ZUBŮ (ODONTOGENEZE).....	19
2.4.1. Vznik zubní lišty.....	19
2.4.2. Vznik zubního pupenu.....	20
2.4.3. Vytváření zubního zárodku.....	20
2.4.4. Mineralizace zubů.....	22
2.4.5. Prořezávání zubů.....	24
2.5. STAVBA ZUBU.....	27
2.5.1. Dentin (substantia eburnea, zubovina).....	28
2.5.2. Sklovina (substantia adamantina, email).....	32
2.5.3. Zubní dřev (pulpa dentis).....	32
2.5.4. Pomocné struktury zubu.....	34
2.5.4.1. Cement (substantia ossea).....	34
2.5.4.2. Periodontální ligamenta (periodontium, periodont).....	36
2.5.4.3. Alveolus (zubní lůžko).....	38
2.5.4.4. Dáseň (gingiva) a gingivodentální uzávěra.....	38
2.6. ZNAČENÍ ZUBŮ.....	40
2.7. METODICKÝ POSTUP HISTOLOGICKÉHO ZPRACOVÁNÍ TVRDÝCH TKÁNÍ.....	42

2.7.1. Demineralizace (dekalifikace, odvápnování).....	42
2.7.2. Zhotovování výbrusů.....	43
<b>3. METODIKA A MATERIÁL.....</b>	<b>45</b>
3.1. METODIKA.....	45
3.1.1. Metodika zhotovování výbrusů.....	45
3.1.2. Metodika dekalifikace a zalévání do Paraplastu X-TRA® .....	47
3.1.3. Statistické zpracování .....	50
3.1.3.1. Stanovení míry korelace odhadovaného a skutečného věku jedince.....	50
3.1.3.2. Chyba odečtu aposičních cementových linií.....	51
3.2. MATERIÁL.....	52
<b>4. VÝSLEDKY.....</b>	<b>55</b>
4.1. STANOVENÍ MÍRY KORELACE.....	57
4.2. URČENÍ CHYBY ODEČTU APOSIČNÍCH CEMENTOVÝCH LINIÍ.....	61
4.3. SROVNÁNÍ METODICKÝCH PŘÍSTUPŮ ZHOTOVOVÁNÍ HISTOLOGICKÝCH PREPARÁTŮ.....	62
<b>5. DISKUSE.....</b>	<b>65</b>
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>69</b>
<b>7. SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ.....</b>	<b>70</b>
<b>8. SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>71</b>
<b>9. SEZNAM TABULEK A GRAFŮ.....</b>	<b>72</b>
<b>10. POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>73</b>

## 1. ÚVOD

Analýza chrupu, jako nástroj při odhadu věku v době smrti, je považována za jednu z nejpřesnějších metod, a to jak v dětství tak v dospělosti. Stanovení míry korelace mezi aposicí cementu na kořeni zubu a chronologickým věkem jedince, je histologickým vyšetřením, které bylo inspirováno pracemi Gustafsona (Gustafson 1950). Je to jedna z metod, jež měly ukázat i jiný směr histologického vyšetřování involučních změn zubů, než jsou klasické Gustafsonovy metody.

Jedná se o stanovení používané především ve forenzní antropologii a v archeologii a je záležitostí posledních pětadvaceti let. V současné forenzní praxi, se s ním však často nesetkáváme, protože je, ve srovnání s jinými metodami stanovení věku, méně propracované. Přesto existují i názory, podložené nedávnými výzkumy, že hodnocení cementových přírůstků na kořenech zubů je možné používat k odhadu věku s vyšší spolehlivostí než jiné morfologické či histologické kosterní metody (Wittwer-Backofen 2004). V zásadě jde o počítání přírůstkových cementových linií na povrchu kořene, podobné počítání letokruhů u stromů. Na barvených či nebarvených řezech (nebo výbrusech) jsou viditelné tmavé a světlé velmi tenké linie, k jejichž odečítání jsou užívány světelné mikroskopy. Odhad věku v době smrti či extrakce zubu, by měl být roven počtu zjištěných prstenců (jeden prsteneček tvoří tmavá a světlá linie), k němuž musí být připočten ještě průměrný věk, ve kterém došlo k erupci vyšetřovaného zubu.

Velkou výhodou zmíněné metody je fakt, že pro stanovení počtu cementových přírůstků můžeme použít také premoláry a moláry (Kagerer 2001), které jsou z klasických Gustafsonových hodnocení úplně vyloučeny. Pro odečet aposičních linií je nejlépe použitelný preparát zhotovený z apikální části kořene, přesněji, z oblasti v 15 – 45% vzdálenosti od vrcholku kořene, v těchto místech je vrstva cementu nejsilnější.

Jak již bylo řečeno, metoda hodnocení aposice cementu částečně žije ve stínu ostatních metod kosterní antropologie, užívaných pro odhad věku jedince, jakými jsou např.: určování podle obliterace lebečních švů, změny vnitřní struktury hlavic dlouhých kostí, změny na styčných plochách symfýzy, změny v oblasti křížokyčelního spojení, změny sternálního konce žeber, osifikace štítné chrupavky atd. Někteří autoři se jejímu plnohodnotnému začlenění do praxe brání, a argumentují tím, že naše znalosti o problematice aposice cementu jsou jen povrchní a není přesně a s jistotou definováno, co pozorovatel počítá. Dále, že vrstvení cementu nelze sledovat v celé šířce, ale jen

v menších úsecích, a tím hodnocení ztrácí na přesnosti. Přesto se však více autorů spíše shoduje na její použitelnosti v rozličných oborech antropologie, forenzní medicíny či archeologie než na jejím zavržení.

Cílem mé diplomové práce bylo:

1. Vypracování vhodných metodických postupů pro zhotovování histologických preparátů nedekalcifikovaných a dekalifikovaných tvrdých zubních tkání, včetně jejich porovnání.
2. Navržení postupu a standardizace podmínek při odečítání cementových aposičních linií.
3. Zjištění míry korelace mezi věkem odhadovaným na základě aposice cementu a skutečným chronologickým věkem na recentním souboru jedinců, pomocí vypracovaného metodického postupu.



## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. URČOVÁNÍ VĚKU PODLE CHRUPU

Odhad věku v době smrti pomocí analýzy chrupu je považován, jak v dětství tak v dospělosti, za jedno z nejpřesnějších stanovení, neboť má relativně blízko ke skutečnému, chronologickému věku. V dětství a během dospívání patří k nejvhodnějším indikátorům vývoj chrupu (Ubelaker 1978), tedy jeho mineralizace a dále, i když méně přesná, erupce zubů. V případě dospělých jedinců, s ukončeným vývojem chrupu, s k odhadu věku používají změny trvalého chrupu, tzv. involuční změny (Stloukal 1999).

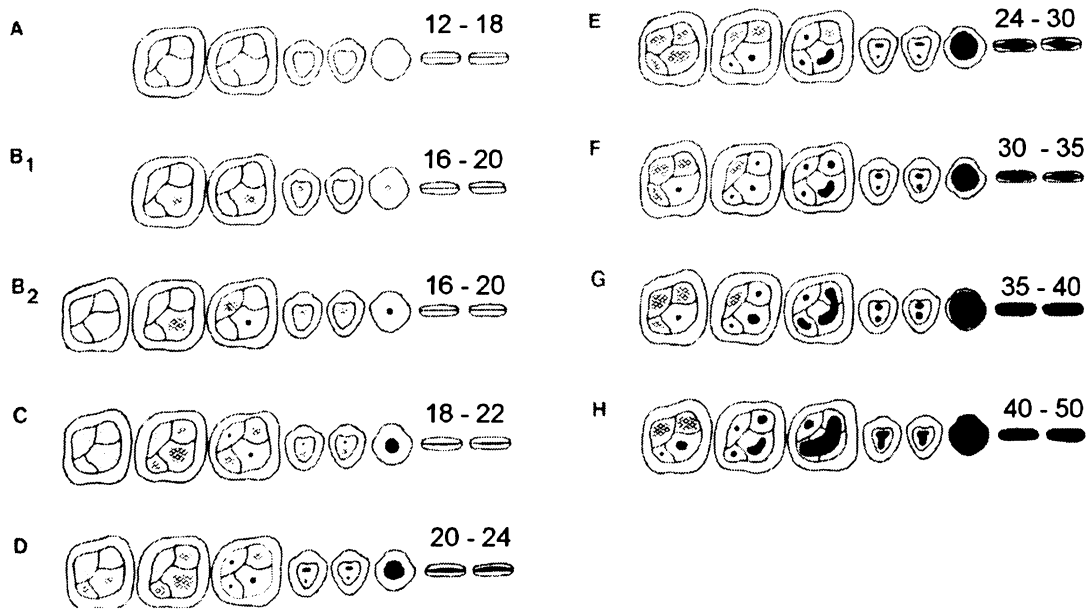
#### 2.1.1. Morfologické změny zubů

Nejnápadnějším znakem postupujícího věku na zubech je jejich opotřebením, zmenšení výšky stěny zubních lůžek (atrofie alveolu) a konečně ztráta zubu (Stloukal 1999).

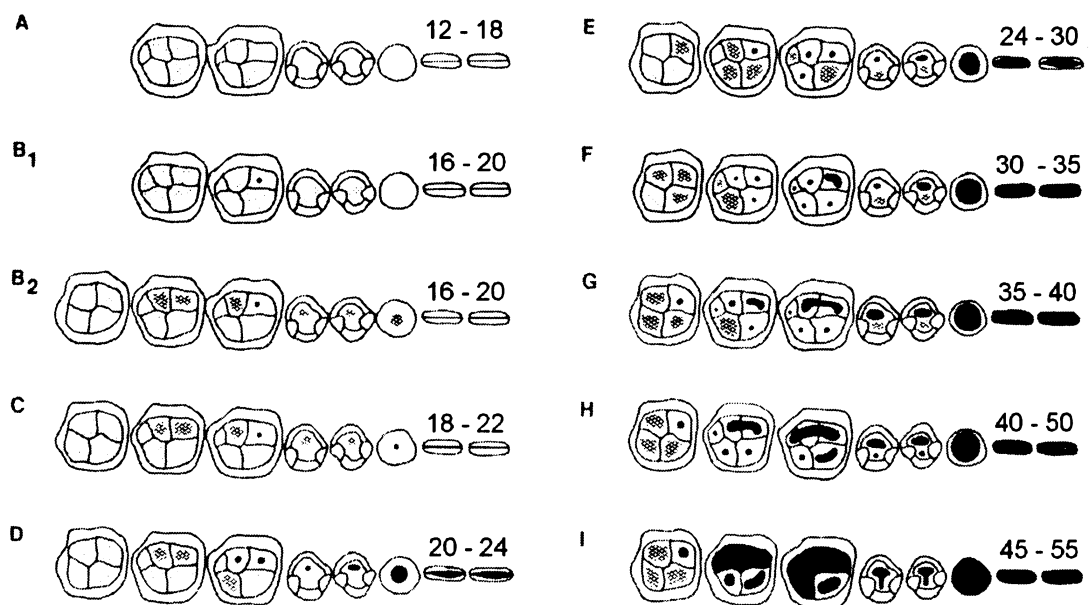
##### 2.1.1.1. Opotřebením zubů (abraze)

K opotřebování zubu začíná docházet bezprostředně po jeho prořezání z dásní. Nejprve jsou obroušeny ostré hrany kousacích ploch, po setření skloviny je obnažen dentin, a poté dochází k opotřebování celé korunky zubu. Zubní abraze je důsledkem celé řady faktorů, z nichž některé jsou převážně výsledkem životního stylu a metabolických procesů organismu. Stupeň abraze se hodnotí pomocí šestibodové stupnice.

I přes tvrzení, že zubní abraze vykazuje malou spolehlivost při odhadu věku (Pilín 1982), lze toto stanovení použít, zvláště při nedostatku jiných znaků, jako nástroj k hrubému třídění věku na mladý, střední a pokročilý. Postupné a podrobné opotřebování kousacích ploch zubů v závislosti na věku sestavili např. Lovejoy 1985b.



Obr. 1 - Stádia abraze zubů horní čelisti s uvedením příslušných věkových intervalů  
(převzato a upraveno z Lovejoy 1985b)



Obr. 2 - Stádia abraze zubů dolní čelisti s uvedením příslušných věkových intervalů  
(převzato a upraveno z Lovejoy 1985b)

### 2.1.1.2. Atrofie zubních lůžek

Se stoupajícím věkem se zvyšuje i vzdálenost okraje lůžka od cemento-sklovinné hranice, dochází tak k atrofii alveolu. Proces silně koreluje s věkem, ale je ovlivněn i chorobnými změnami, které se stoupajícím věkem častěji objevují (např. parodontóza). Patologické změny jsou na věku nezávislé, a proto význam odhadu věku při jejich výskytu na dentici klesá (Stloukal 1999).

### 2.1.1.3. Ztráta zubu

Počet chybějících zubů může posloužit jako rychlá metoda odhadu věku, ale provádět odhad pouze na základě tohoto znaku by bylo nevhodné a s vysokou pravděpodobností velice nepřesné.

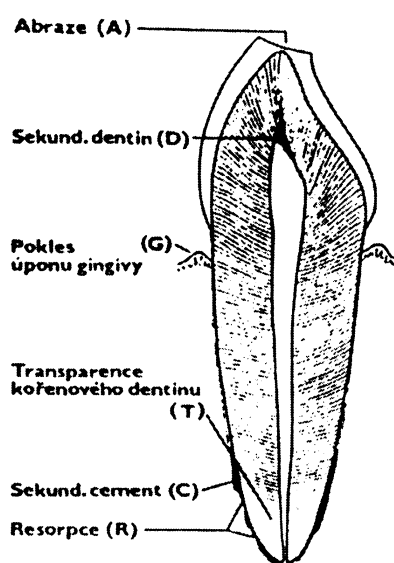
## 2.1.2. Histologické metody

S odhadem věku na základě hodnocení morfologických změn zubů na tenkých řezech přišel Gustafson 1950. Hodnotil vývojové změny zubů související s věkem a jednalo se o abrazi, změny v úponu dásně (pokles parodontu), ukládání sekundárního dentinu uvnitř dřeňové dutiny zubu, transparenci kořenového dentinu, aposici sekundárního cementu na povrchu kořene a konečně resorpci kořenového hrotu. Na každém řezu přiřazoval jednotlivým znakům body a jejich součtem získal celkové skóre, které vysoce korelovalo ( $r = 0,98$ ) se známým věkem 41 vyšetřovaných jedinců. Gustafsonova metoda je založena na jednoduché lineární regresi všech šesti znaků sečtených dohromady. Nedostatkem metody však je stejná váha všech hodnocených znaků, a proto řada autorů na jeho práci navázala a dále ji rozpracovala. Většina Gustafsonových pokračovatelů vychází z jeho původní třibodové hodnotící stupnice změn tvrdých zubních tkání, i když je často zpřesňována jemnějším pŕlbodovým dělením.

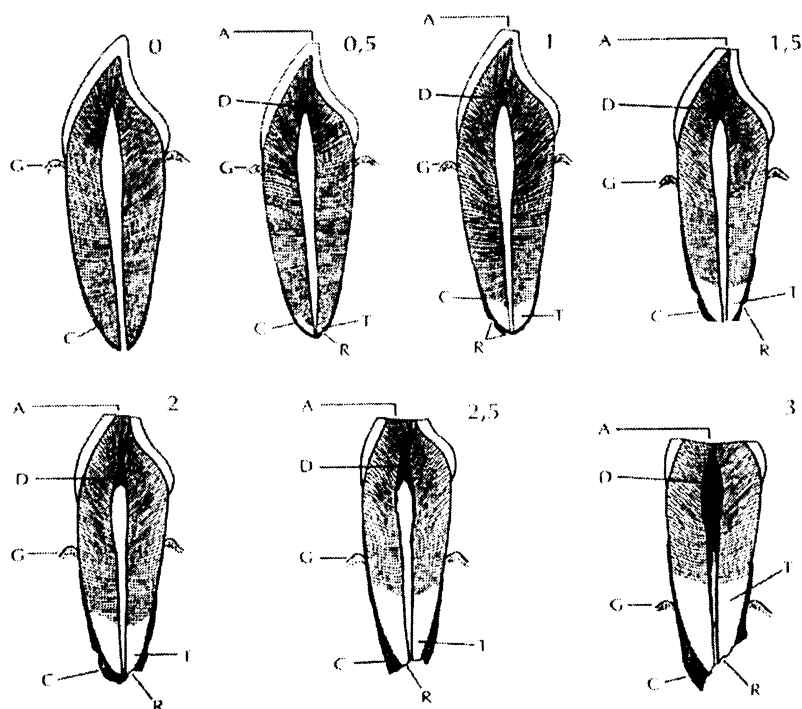
Nejznámějším autorem u nás, který rozpracoval Gustafsonovu metodu pro frontální zuby je Kilián 1981. Zuby byly před hodnocením zality do tvrdé pryskyřice (dentacrylu) a následně vybroušeny do sagitálního řezu o síle 100-250  $\mu\text{m}$

s rovnoběžnými plochami. Na nebarvených výbrusech byly bodově hodnoceny následující změny:

- abraze (A)
- úpon gingivy (G)
- sekundární dentin (D)
- sekundární cement (C)
- resorpce povrchu kořene (R)
- transparence kořenového dentinu (T)



Obr. 3 - Involuční změny sledované na výbrusech frontálních zubů podle Kiliána  
(Kilián 1981)



Obr. 4 – Bodové hodnocení morfologických změn sagitálního řezu zubem podle Kiliána (Kilián 1981)

Každé z pozorovaných změn byly přiřazeny body ze stupnice 0 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5 3,0 a součet bodů (y) hodnocený zub orientačně zařadil do jedné ze tří věkových kategorií, zvláště pro muže a ženy. Každá z kategorií obsahovala konstanty, které se následně dosadily do rovnice pro výpočet věku.

Ovšem ani Kiliánova upravená metoda nezohledňuje váhu jednotlivých změn. O nápravu se u nás snažili např. Pilin a Šturmankin 1987, kteří ve své práci přisoudili větší váhu třem znakům, a sice atrofii alveolu (P), transparentci (T) a aposici sekundárního dentinu (D). Atrofii alveolu (P) nahradili vzdálenost úponu dásně od cemento – sklovinné hranice označované jako (G). Nejspolehlivějších odhadů věku je dosahováno do 35 let vyšetřovaného jedince. Tato metoda je ve forenzní praxi běžně užívána a vykazuje velmi dobré výsledky.

Další modifikací Gustafsonovy metody u nás, byla její úprava pro potřeby historické antropologie a paleoantropologie autory Vlčkem a Mrklasem (Vlček 1975). Ze souboru znaků vyloučili ty, které nelze na historickém kosterním materiálu zjistit, jako jsou úpon gingivy (G) a transparence dentinu (T) a hodnotili tak pouze zbylé čtyři znaky.

## 2.2. HISTORIE METODY HODNOCENÍ CEMENTOVÝCH APOSIC

Ve svých začátcích byla metoda využívána pouze k určování věku u zvířat. Bylo zjištěno, že aposiční linie cementu jsou obzvláště patrné u savců se sezónními změnami v příjmu potravy, což bylo pozorováno např. u migrujících tuleňů (Mansfield 1960 in Naylor 1985), hibernujících medvědů (Free 1966 in Naylor 1985) nebo lišek (Sedláčková 2005). Během dalších 30 let výzkumů bylo zmíněné metody využito k určení věku mnoha živočišných druhů (Klevezal 1967).

Prvním využitím cementu, k odhadu věku u lidí, byla měření celkové tloušťky cementové vrstvy na povrchu zubního kořene (Gustafson 1950). Jedním z prvních, kdo aplikoval metodu hodnocení aposice cementových linií na lidské zuby byl počátkem 80. let Stott 1982. Jeho soubor obsahoval pouze 17 zubů od 3 jedinců (57, 67 a 76 let) a pro počítání cementových přírůstků používal nedekalcifikované příčné řezy o tloušťce 100-150  $\mu\text{m}$ , které zhotovil sériově od hrotu kořene směrem ke krčku zubu. Tímto postupem dosáhl vysoké shody mezi odhadovaným a skutečným věkem jedince. Navázal na práci řady autorů, kteří tuto metodu s úspěchem používali na savčích zubech (např.: Marks 1966, Klevezal 1967, Wada 1978 a další). Vycházel z předpokladu, že pokud se cementové linie vyskytují u všech doposud studovaných savčích rodů, měly by být přítomny také u lidí.

Další technické zdokonalení metodického postupu (Naylor 1985) vedlo k tomu, že zmiňovaná metoda byla, v porovnání s ostatními metodami založenými na vyšetřování zubů, navržena jako výhodnější pro odhad věku jedince. Autor tvrdil, že aposiční cementové linie jsou snadno počítatelné u zvířat s pravidelnými sezónními změnami v příjmu potravy. V případě lidí tomu tak vždy není, a tak vypracoval postup na zhotovování preparátů, při kterém bylo možné linie odečítat přesněji. Nedekalcifikované zuby krájel na poloténkové podélné řezy (100  $\mu\text{m}$ ) a barvil je krystalovou violetí či toluidinovou modří, a poté fotografoval ve světelném mikroskopu.

Zpočátku se metoda cementových linií aplikovala pouze na čerstvě extrahované zuby, Großkopf 1989 však prokázal, že metoda je použitelná také na historický kosterní materiál a žárové pohřby. Tento závěr potvrdila i řada dalších autorů (např.: Charles 1986, Condon 1986 nebo Lipsinic 1986).

Charles 1986 provedl důkladnou a odbornou analýzu, podloženou množstvím laboratorních pokusů, kdy hodnotil soubor 42 mandibulárních špičáků a prvních

premolárů, a metodu plně doporučuje. Demineralizované zuby krájel na tenké řezy o 7  $\mu\text{m}$ , které byly poté nezávisle hodnoceny dvojicí pozorovatelů. Závislost mezi skutečným věkem a zjištěným počtem cementových linií byla signifikantní a navíc, jako jednomu z mála autorů, se jevila silnější u žen než u mužů. Nezdary odpůrců tohoto stanovení přičítá použití malého zvětšení při odečítání aposičních linií. Zároveň však upozorňuje na skutečnost, že spolehlivost odhadu není v průběhu života stejná a chyba vzrůstá s přibývajícím věkem (např.: od odchylky 4,5 roku ve 24 letech až po 9,3 roku v 60 letech), což platí i v dalších metodách stanovení biologického věku.

Lipsinic 1986 studoval soubor 31 extrahovaných zubů, ze kterých zhotovoval histologické řezy dekalifikovaných kořenů o síle 5  $\mu\text{m}$ . Byly hodnoceny vždy dva řezy z každého zubu a to prostřednictvím tří různých pozorovatelů. Průměrný počet cementových aposic ze všech stanovení, přičtený k věku erupce daného zubu, představovaly odhadovaný věk jedince. Tento odhadovaný věk vysoce koreloval se skutečným věkem ( $r = 0,85$ ) a závislost byla silná zejména u jedinců do 30 let.

Později se metoda odečtu cementových aposic rozšířila i do oblastí forenzních věd (Jankauskas 2001), přestože stále zůstávají nevyřešené některé problémy s plnohodnotnou aplikací metody, především do jaké míry může být stanovení ovlivněno zubními nemocemi (parodontóza atd.). V tomto směru nejsou autoři stále za jedno, např. Großkopf 1996 nenašel žádnou souvislost mezi parodontózou a počtem cementových linií, zatímco Kagerer 2001 zdůrazňuje, že tato patologie snižuje až zastavuje tvorbu cementových linií na povrchu kořene zubu.

Mezi největší odpůrce zmiňované metody lze zařadit např.: Lucas 1986 nebo Miller 1988.

Lucas 1986 provedl studii souboru o počtu 41 extrahovaných zubů a ve výsledku nepodporuje názor, že cementové aposiční linie vznikají každoročně. V jeho vzorku mají počty zjištěných cementových linií tendenci k podhodnocování skutečného chronologického věku jedince, korelační koeficient byl nízký.

Miller 1988 provedl rozsáhlé hodnocení souboru 100 extrahovaných zubů, jako reakci na překvapivě přesné výsledky Stott 1982. Z každého zubu zhotovil jeden řez a pouze 71% řezů bylo vhodných pro odečítání cementových linií. Shodu mezi počtem aposic a věkem v době extrakce zubu označil přinejlepším za průměrnou a u osob starších 35 let za slabou. Celkově označil metodu využívání cementových přírůstků pro odhad chronologického věku jedince na základě regrese jako nevhodnou. Zdůvodněním bylo, že cementová vrstva na lidských zubech je silná jen několik desítek mikrometrů, a proto

se zdá nepravděpodobné, že řezy o tloušťce více než 100  $\mu\text{m}$  dovolují pod světelným mikroskopem spolehlivé vyšetření. Z tohoto důvodu byly závěry, ke kterým dospěl Stott 1982 pro Millera (Miller 1988) velice překvapivé a zpochybňoval je.

V současné době je metoda stanovení cementových aposic na povrchu kořene zubu běžně užívána forezními antropology především v Německu a dalších anglosaských zemích.



## 2.3. PŮVOD CEMENTOVÝCH APOSIČNÍCH LINIÍ

Výskyt cementových aposičních linií, pozorovaný u více než 50 různých druhů savců po celém světě, pravděpodobně odráží přirozený metabolický rytmus, vyvolaný sezónními změnami (Wittwer-Backofen 2004). U volně žijících savců korespondují světlé aposiční cementové linie se zimním obdobím a tmavé s letním obdobím. Předpokládá se, že světlé pruhy jsou na rozdíl od tmavých hypomineralizované (Kagerer 2001). Také Hillson 1996 a Lieberman 1994 vidí primární příčinu rozdílného vzhledu tmavých a světlých linií cementové vrstvy v mikrostruktuře, konkrétně v odlišné orientaci kolagenních vláken a v různém stupni mineralizace (Maat 2006).

Roční cementové přírůstky, představované střídajícími se tmavými a světlými pruhy, jsou vytvářeny působením parathormonu, který je zodpovědný za regulaci hladiny vápníku v krvi, a vitamínu D, který reguluje resorpci vápníku. Oba zmíněné faktory mohou ovlivňovat produkci cementových aposic společně s řadou dalších chemických a fyzikálních vlivů z vnějšího prostředí. Těmito vlivy, které se podílejí na cementogenezi jsou například: výživa, hormonální cykly, teplota, ultrafialové záření, vlhkost, nadmořská výška nebo znečištění (Lieberman 1994, Kagerer 2001).

Bylo zjištěno, že na každoroční produkci cementových přírůstků nemají téměř žádný vliv kariózní léze, funkční poruchy, poruchy okluze, protetická léčba, hypercementosis ani žádná další onemocnění nebo předešlá těhotenství. Ani další faktory, jako kouření, konzumace alkoholu nebo ústní hygiena nemají přímý vliv na aposici cementu (Kagerer 2001). Stejně tak provedené studie ukazují, že neexistuje žádný statisticky významný vliv pohlaví, typu zubu a výskytu parodontózy na kvalitu odhadu věku pomocí metody odečtu cementových aposic (Wittwer-Backofen 2004). V případě studie Kagerer 2001 bylo sice zjištěno, že nejmenší odchylku odhadovaného a skutečného věku vykazují řezáky, překvapivě následované třetími moláry, ale ani v případě špičáků, premolárů a prvních a druhých molárů nebyla odchylka mezi věky statisticky signifikantní. Navíc, tato studie, díky vysoké korelaci mezi skutečným a odhadovaným věkem u třetích molárů, opět popřela tvrzení, že pro formování cementových aposic je nutná funkce žvýkání.

Stále však zůstává mnoho nezodpovězených otázek týkajících se mechanismu tvorby cementových aposičních linií a vlivů na ni. Například vrstvení cementu se v rámci jednoho zubu liší, a je proto nutné zhotovit několik řezů, aby byl zjištěn jednotný

počet prstenců (Renz 2006). Některé zuby přitom produkují neobvykle vysoký počet těchto vrstev. Dále, že závislost počtu vrstev na věku není přímá, většina autorů používá průměrný věk erupce jako věk reprezentující vznik první cementové vrstvy, ale to nemusí být vhodné. A v neposlední řadě, že biologická podstava vzniku cementových vrstev není známa – „nikdo není, co je ve skutečnosti počítáno“ (Hillson 1996).

## 2.4. VÝVOJ ZUBŮ (ODONTOGENEZE)

Vývoj zubů je dlouhodobý proces začínající v 5.-6. embryonálním týdnu a končí většinou po 18. roce života.

Dentice se vyvíjí postupně, nejprve se prořezávají zuby dočasného chrupu – 2 řezáky, 1 špičák a 2 dočasné stoličky v každé polovině čelisti. Později se přidávají tzv. zuby doplňkové – 2 stoličky a posléze zuby trvalého chrupu – 2 řezáky, 1 špičák, 2 třenové zuby, které nahradí zuby dočasné dentice. Nakonec se prořezává poslední z doplňkových zubů – třetí stolička (Čihák 2002).

Vývoj probíhá postupně, nejdříve jsou patrné zubní pupeny v předním úseku mandibuly poté v přední části maxily a až na konec se vyvíjejí zuby v distálních oddílech zubních oblouků.

Proces odontogeneze je rozdělen do několika fází (Junqueira 1999):

- vznik zubní lišty
- vznik zubního pupenu
- vytváření zubního zárodku
- mineralizace zubu
- prořezávání zubu
- resorpce kořenů a následná ztráta dočasného chrupu spojená s vývojem a prořezáváním chrupu trvalého

### 2.4.1. Vznik zubní lišty

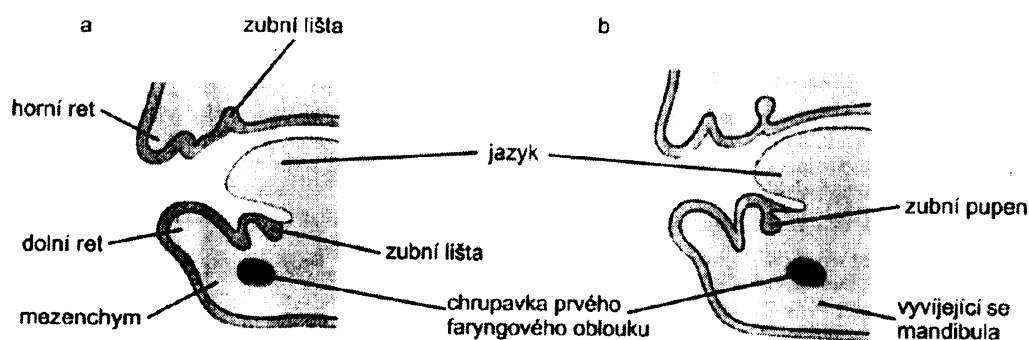
V 5.-6. týdnu embryonálního vývoje začíná proliferace ektodermálního epitelu a na okraji primitivních rtů vytváří rýhy obloukovitého tvaru. Epitel prorůstá do mezenchymového základu rtu jako labiogingivální lišta, která se později po celém svém průběhu rozdělí na zevní – labiální část, základ pro horní a dolní ret a na část vnitřní – gingivální, představující základ dásně. Štěrbina mezi rtem a dásní se prohlubuje a postupně mění ve vestibulum oris.

Společně s vývojem labiogingivální lišty vzniká v primitivní gingivě také lišta dentogingivální. Gingivální epitel této lišty proniká směrem do mezenchymu jako dentální lišta – lamina dentalis (Vilímovská 1993), a stává se tak prvním projevem

vývoje zubů. Vytváří souvislé epitelové pruhy tvaru písmene U, zanořené do mezenchymu gingivy, které kopírují zakřivení čelistí.

#### 2.4.2. Vznik zubního pupenu

Koncem 6. týdne se v každé ze zubních lišt vytvoří deset proliferačních center v každé čelisti, tzv. zubní pupeny, což jsou základy budoucí dočasné dentice. Jedná se o váčky kulovitého tvaru, vrůstající do přilehlého mezenchymu. Epitelový pruh zajišťuje spojení s povrchovým epitelem gingivy. Zubní pupeny trvalé dentice se formují hluboko v zubní liště asi o 4 týdny později než zubní pupeny dočasné dentice. Vyvíjejí se lingválně od zubních pupenů pro dočasné zuby. Trvalé moláry nemají žádné předchůdce v dočasné dentici, to znamená, že jejich pupeny vznikají z distálních výběžků zubních lišt. Zubní pupeny trvalé dentice se objevují převážně v průběhu fetálního období, zatímco pupeny druhých a třetích permanentních molárů vznikají až po narození (Moore 2002).



Obr. 5 – Nákres sagitálního řezu vyvíjejícími se čelistmi (Moore 2002):  
a) začátek 6. týdne (zformování zubních lišt)  
b) konec 6. týdne (objevují se zubní pupeny)

#### 2.4.3. Vytváření zubního zárodku

Zubní pupeny uložené v zubní liště prochází řadou diferenciačních procesů. Především dochází k hlubšímu zanoření do mezenchymu gingivální lišty a na straně odvrácené od dentální lišty se do epitelové stěny začíná vtláčovat kondenzovaný

mezenchym. Invaginací mezenchymu nabývá zubní pupen tvaru čepičky. Ektodermová část zubního základu se označuje jako sklovinný orgán a je tedy určena k produkci zubní skloviny. Vnitřní část čepičky je tvořena mezenchymem a tvoří základ zubní pulpy. Sklovinný orgán a zubní papila společně tvoří zubní zárodek. Samotný sklovinný orgán se diferencuje na zevní vrstvu buněk sklovinného orgánu tzv. zevní sklovinný epitel a buňky tvořící vnitřní výstelku tzv. vnitřní sklovinný epitel. Prostor mezi oběma listy sklovinného orgánu je vyplněn řídkou epitelovou tkání zvanou sklovinné retikulum. S postupným vývojem zubního zárodka dochází také ke kondenzaci mezenchymu kolem zárodka a vytváří se tak vaskularizovaná kapsulární struktura zubního vaku. Ze zubního vaku později vzniká cement a systém periodontálních ligament. Zubní lišta, zajišťující kontakt zubu s orálním epitelem, naopak postupně degeneruje.

Stádium zubní čepičky přechází díky vývoji sklovinného orgánu do stádia zvonku. Dochází k diferenciaci odontoblastů z mezenchymových buněk přiléhajících k vnitřnímu sklovinnému epitelu. Odontoblasty zahajují produkci predentinu, který se ukládá těsně k epitelu a pozdější mineralizací (kalcifikací) se mění v dentin. Vrstva dentinu roste a odontoblasty se tak posouvají k centru dentální papily. Odontoblasty zůstávají v dentinu zakotveny pouze prostřednictvím Tomesových vláken, což jsou tenké cytoplazmatické výběžky. Funkce odontoblastů přetrvává po celý život a rostoucí vrstva dentinu způsobuje zmenšování dřeňové dutiny zubu (Vilímovská 1993). Pod vrstvou odontoblastů v mezenchymu probíhá hustá síť krevních kapilár, která vyživuje sklovinný orgán i samotný mezenchym (tedy budoucí zubní pulpu). Buňky vnitřního sklovinného epitelu se diferencují v ameloblasty, produkující sklovinu ve formě prizmat, která obalují dentin. Tvorba skloviny i dentinu probíhá současně. S rostoucí vrstvou dentinu se ameloblasty posouvají směrem k zevnímu sklovinnému epitelu. Produkce skloviny i dentinu začíná na vrcholu budoucí zubní korunky a postupuje k zubnímu krčku. Ameloblasty zanikají po vytvoření korunky a ta poté zůstává kryta pouze zubní kutikulou, jež se po prořezání zubů trhá. Z mezenchymu zubní papily vzniká rosolovitá zubní dřeň, obsahující bohatou krevní, mízní a nervovou pletěň, které se však diferencují až po narození.

Zubní kořen se začíná formovat později, krátce před prořezáním korunky zubu. Zevní a vnitřní sklovinný epitel se stýká v oblasti zubního krčku, kde vytváří záhyb, tzv. epitelovou (Hertwigova) zubní pochvu. Ta vrůstá do mezenchymu a zahajuje tvorbu kořene zubu. Odontoblasty, které přiléhají těsně k epitelové zubní pochvě produkují

dentin, který je pokračováním dentinu zubní korunky. Růstem dentinu se dřevná dutina postupně redukuje až na úzký kořenový kanálek, kterým prochází cévy a nervy. Mezenchymové buňky uložené uvnitř dentálního vaku se diferencují v cementoblasty, které na povrchu kořene zubu produkují cement. Pouze v oblasti krčku komunikují se sklovinou v linii zvané cemento – sklovinná hranice (Hillson 1996).

#### 2.4.4. Mineralizace zubů

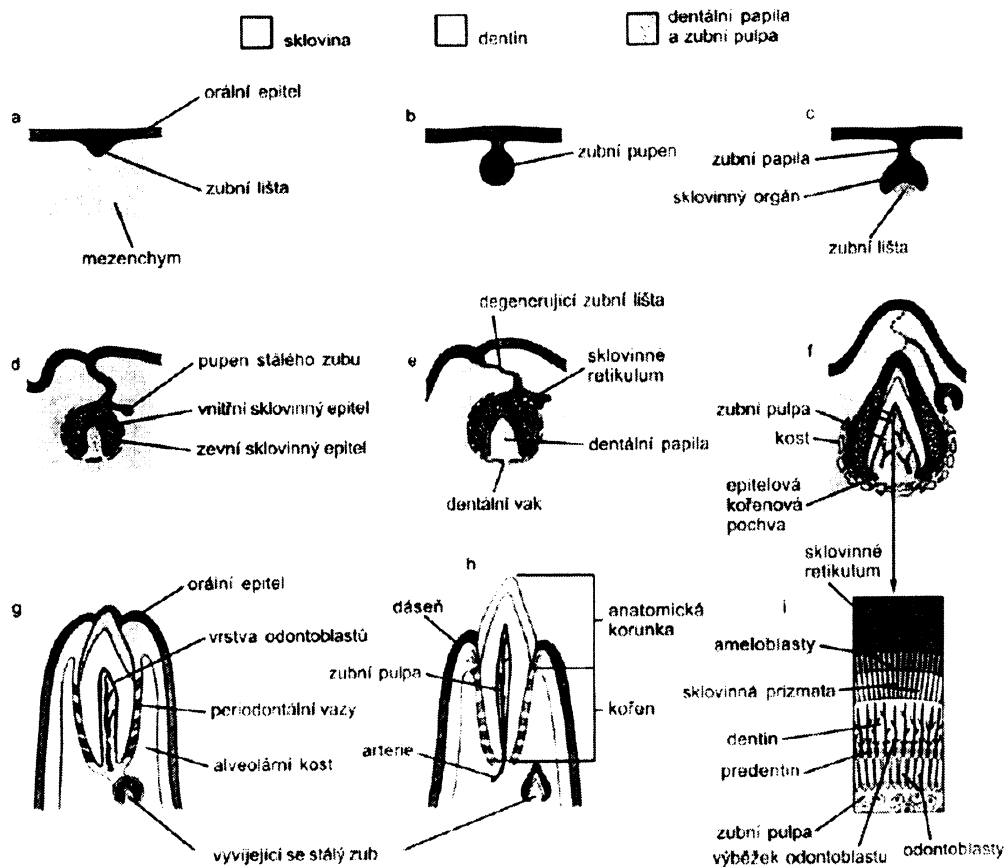
Mineralizace zubů dočasné dentice je zahájena v 5.- 6. měsíci prenatálního vývoje a u zubů trvalé dentice začíná až po narození. Mineralizace u obou typů dentice postupuje podle stejného schématu. V první řadě je vždy kalcifikována korunka zubu, a to nejprve pouze ve formě ohraničených mineralizačních center, která postupně splývají v souvislou okluzní plochu. Poté následuje mineralizace krčku a kořene. V souvislosti s růstem zubů a osifikací čelisti, dochází k aktivaci zevní buněčné vrstvy dentálního vaku a zahajují tvorbu zubní tkáně, která každý zub obklopuje. Vytváří se tak zubní alveoly, ve kterých jsou pevně, ale pružně ukotveny jednotlivé zuby pomocí periodontálních ligament. Vlákna tohoto závěsného aparátu zubu jsou na jedné straně uchycena do cementu na kořeni zubu a na druhé straně do kostní tkáně zubního alveolu.

Mineralizace zubů patří k předním indikátorům chronologického věku u dětí a dospívajících (Stloukal 1999). Této problematice se věnovala celá řada autorů, lze jmenovat např. Komínek 1984 nebo Ubelaker 1978. Vývoj zubu, jeho mineralizace, je proces geneticky determinován hypofýzou, a proto jen slabě podléhá vlivům zevního prostředí a není ovlivňován ani předčasnou ztrátou zubů dočasné dentice. Proto existuje těsnější vztah mezi chronologickým věkem jedince a mineralizací než prořezáváním zubů.

Vývoj dočasných i trvalých zubů byl na základě rtg snímků rozdělen do několika stádií (Junqueira 1999):

- I. stádium: vznik zubního folikulu
- II. stádium: období počínající mineralizace, výskyt mineralizačních center
- III. stádium: vznik souvislé okluzní plochy
- IV. stádium: počínající tvorba kořene, zúžení krčku a vytvoření spodiny dřevné dutiny

- V. stádium: růst kořene, divergence stěn kořenového kanálku
- VI. stádium: téměř definitivní délka kořene, ale paralelní stěny kořenového kanálku
- VII. stádium: definitivní délka kořene s konvergentními stěnami kořenového kanálku k hrotu kořene



Obr. 6 – Schematické nákresy vývoje řezáku – sagitální řez (Moore 2002):

6. týden (objevuje se zubní lišta)
7. týden (z lišty vyrůstají zubní pupeny)
8. týden (zubní primordia ve stadiu čepičky)
10. týden (dočasné zuby ve stadiu zvonku, trvalé zuby ve stadiu pupenu)
14. týden (pokročilé stadium zvonku)
28. týden (vyvíjí se sklovina a dentin)
6. měsíc po narození (prořezání prvního zubu)
18. měsíc po narození (plně prořezaný dočasný zub a trvalý řezák s dobře vyvinutou korunkou)
- průřez dospělým zubem znázorňující ameloblasty (produkují sklovinu) a odontoblasty (produkují dentin)

## 2.4.5. Prořezávání zubů

Prořezávání neboli erupce zubů je jednorázový, časově omezený děj řízený hormony štítné žlázy, a narodil od procesu mineralizace, s možností působení vlivů z vnějšího i vnitřního prostředí, což snižuje korelaci s chronologickým věkem jedince.

Postupným prodlužováním kořene je korunka tlačena k povrchu a zuby tak pomalu stoupají směrem k ústní dutině. Korunka zubu se prořezává epitelem ústní dutiny a sliznice obklopující korunku se mění v dásně. Erupce dočasné dentice probíhá mezi 6.-24. měsícem života a zpravidla je zahájena prořezáním mesialních řezáků ve věku 6.-8. měsíce. Kompletní dočasná dentice o dvaceti zubech je u zdravých dětí vytvořena do 2. roku života. Trvalý chrup se vyvíjí podobně jako dočasný, pouze s tím rozdílem, že zůstává v latentní fázi až do 6. roku života a během 6. roku zuby trvalé dentice zahajují erupci. Vlivem růstu zubu trvalé dentice je kořen příslušného zubu dočasné dentice postupně resorbován činností osteoklastů. Tlak vyvíjený růstem zubu trvalé dentice zespoda napomáhá vypadávání zubů dočasných. Při ztrátě zubu dočasné dentice je tento zub tvořen pouze korunkou a zbytkem horní části kořene.

Uvolňování dočasných zubů z čelistí probíhá v pořadí (Perlíková 2006):

- řezáky mezi 5. – 8. rokem
- špičáky mezi 10. – 12. rokem
- stoličky mezi 10. – 12. rokem

Během procesu nahrazování dočasné dentice trvalou denticí rozlišujeme i období tzv. smíšené dentice, což je kombinace dočasných a stálých zubů v různém stádiu vývoje. Období smíšené dentice začíná kolem 5. – 6. roku obvykle prořezáním prvního stálého moláru a pokračuje do 12. – 13. roku.

S růstem kořene je spojeno i prodlužování alveolárních výběžků zubů a čelisti se musí této změně adaptovat. Výsledkem je výrazné ovlivnění tvaru obličeje (Moore 2002).

Obecně platí, že zuby dolní čelisti se prořezávají dříve než zuby horní čelisti a u děvčat dochází k prořezání obvykle dříve než u chlapců.

Vzorec prořezávání dočasné dentice pro českou populaci je: **i1 i2 m1 c m2**

Vzorec prořezávání trvalé dentice pro českou populaci je:

- horní čelist: **M1 I1 I2 (P1 C P2) M2 M3**



- dolní čelist: (M1 I1) I2 (C P1 P2) M2 M3

Deciduální (dočasná) dentice	
Horní čelist	Věk prořezání (v měsících)
mesiální řezáky	6. - 8.
laterální řezáky	9.
špičáky	16. - 20.
prvé moláry	12. - 16.
druhé moláry	20. - 30.
Dolní čelist	
mesiální řezáky	6.
laterální řezáky	7.
špičáky	16. - 20.
prvé moláry	12. - 16.
druhé moláry	20. - 30.

Tab. 1 – Věk prořezání zubů dočasné dentice (Perlíková 2006)

Permanentní (trvalá) dentice	
Horní čelist	Věk prořezání (v letech)
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.
Dolní čelist	
mesiální řezáky	6. - 7.

laterální řezáky	7. – 8.
špičáky	9. – 10.
prvé premoláry	10. – 12.
druhé premoláry	11. – 12.
prvé moláry	5. – 6.
druhé moláry	12. – 13.
třetí moláry	17. – 21.

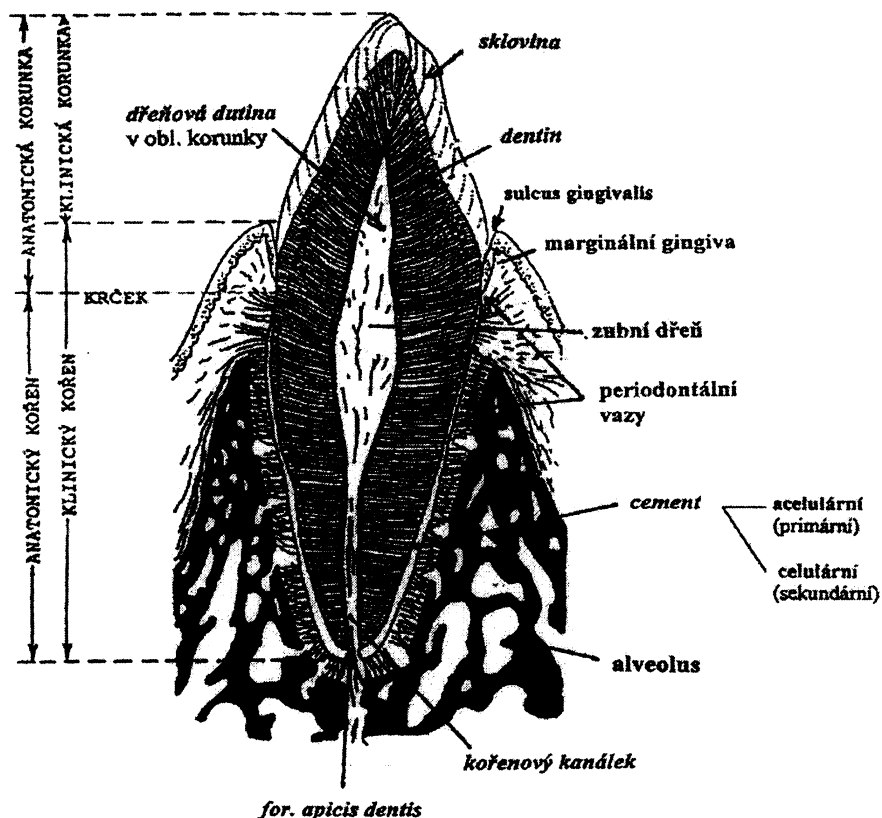
Tab. 2 – Věk prožezání zubů trvalé dentice (Perlíková 2006)

## 2.5. STAVBA ZUBU

Zub se dělí na korunku (corona dentis), prominující nad rovinu dásně a kořen (radix dentis), jeden či více, podle typu zubu, uložený v kostním lůžku zvaném alveolus. Ten je skryt v čelisti a každý zub má svůj vlastní alveolus. Přechodná část mezi korunkou a kořenem je označována jako krček (cervix). Korunku zubu je možné dále specifikovat na korunku klinickou, viditelnou v ústech jedince, a na anatomickou, jež je vymezena cemento-sklovinnou hranicí. Stejně tak kořen dělíme na klinický, od apexu po dáseň, a anatomický od apexu po krček (cemento-sklovinnou hranici).

Zub je tvořen dvěma typy tkání - tvrdou, což je sklovina, dentin a cement a měkkou tkání, jenž představuje zubní pulpa. Převážnou část zubu vytváří mineralizovaný dentin (zubovina) a obklopuje dřeňovou dutinu (cavum pulpae), která je vyplněna měkkou tkání – zubní dřeví (pulpu). Dřeňová dutina začíná na apexu kořene malým otvůrkem (foramen apicis dentis), kudy do pulpy vstupují krevní a lymfatické cévy a nervy, a pokračuje jako kořenový kanál (canalis radialis dentis) dále do korunky. Na povrchu je korunka kryta nejtvrdějším materiálem lidského těla - sklovinou (email) a kořen je pokryt cementem. Místo kontaktu skloviny a dentinu se nazývá dentino-sklovinná hranice. Pevnou fixaci zubu v alveolu zajišťují periodontální ligamenta, což jsou kolagenní vlákna zakotvená v cementu kořene na jedné straně a v kostní tkáni zubního alveolu na straně druhé (Junqueira 1999).

Mikroskopická stavba zubů dočasné (deciduální, primární, mléčné) a stále (permanentní, sekundární) dentice se liší jen minimálně. Z makroskopického hlediska se odlišují hlavně na základě velikosti. Zuby primární dentice jsou menší s výraznějším krčkem a nízkou korunkou, mají tenčí vrstvu primárního dentinu a širší dřeňovou dutinu v korunce i kořeni. Kořeny zubů primární dentice jsou oproti kořenům zubů stálé dentice konvergentnější (Čihák 2002).



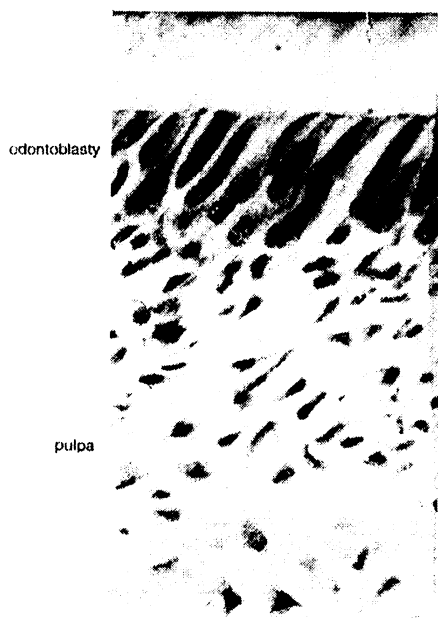
Obr. 7 - Sagitální řez řezákem (Mazurová 2004)

### 2.5.1. Dentin (substantia eburnea, zubovina)

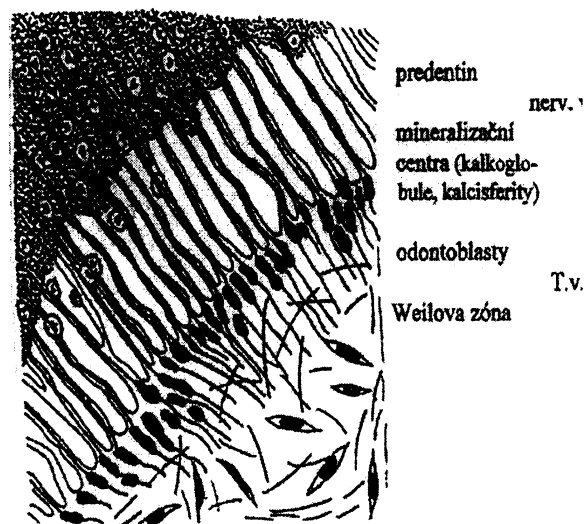
Dentin je mineralizovaná tkáň podobající se kosti, ale díky vysokému obsahu vápenatých solí je tvrdší. Anorganické látky představují 80 % a organické materiály 20 % obsahu dentinu. Z organické složky převážnou část tvoří kolagenní vlákna typu I, kterých se stoupajícím věkem přibývá, glykosaminoglykany a z anorganické složky jsou to především soli kalcia ve formě krystalů hydroxyapatitu (představující až 70 % suché hmotnosti).

Organická matrix dentinu, tedy sekreční granula obsahující protokolagen a amorfní hmota, je produkována odontoblasty, které lemují vnitřní povrch zubu a oddělují jej od dřeňové dutiny. Odontoblasty jsou polarizované štíhlé cylindrické buňky produkující základní organickou hmotu pouze na povrchu přivráceném k dentinu. Jádro je uloženo při bázi, na opačném pólu buňky. Buněčná těla jsou v horní části

vzájemně propojena dezmosomy a v cytoplazmě je patrné velké množství buněčných organel a četná sekreční granula s prekurzory predentinu. Odontoblasty také vysílají tenké větvené cytoplazmatické výběžky, které kolmo pronikají dentinem jako tzv. Tomesova vlákna. Cytoplazma výběžků obsahuje pouze mikrofilamenta, mikrotubuly a sekreční granula. Tyto výběžky se růstem dentinu prodlužují a probíhají v malých kanálcích (canaliculi dentis), jež spolu řídce anastomozují a na dentino-sklovinné hranici se bohatě větví. Úkolem Tomesových vláken je zprostředkování látkové výměny v dentinu. Na opačném konci každého odontoblastu se nacházejí i tzv. bazální výběžky, které vybíhají na krátkou vzdálenost do pulpy, kde s výběžky buněk pulpy (pulpocyty) a vlákný vaziva tvoří nebuněčnou Weilovu zónu (Stevens 2005).



Obr. 8 - Mikrofotografie zubní pulpy (Junqueira 1999, zvětšení 400x)

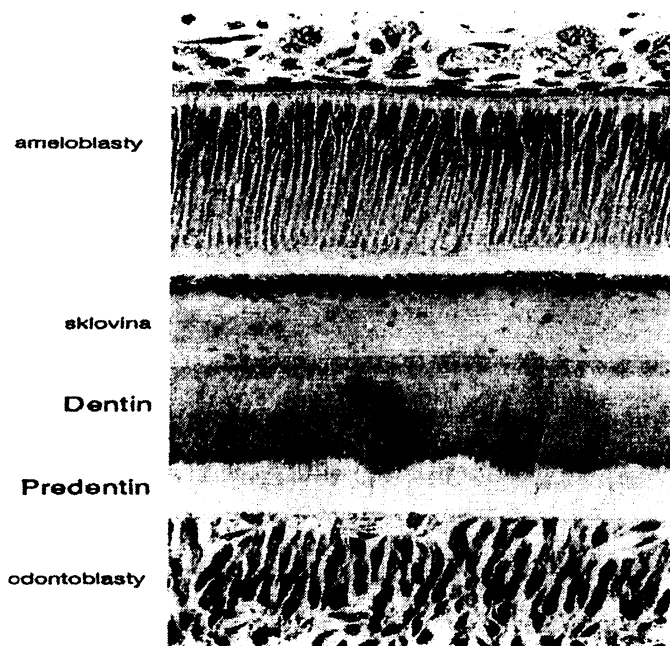


fibroblasty, vlákna a amorfni hmota  
rosolovitého vaziva zubní dřevě

Obr. 9 - Hranice dentinu a pulpy (Mazurová 2004)

Dentin je inervován prostřednictvím nemyelinizovaných nervových vláken. Ta prostupují mezi odontoblasty, přes predentin a s Tomesovými vlákny vstupují na krátkou vzdálenost do dentinivých tubulů. V tubulech se nervy přikládají na Tomesovo vlákno a vytvářejí s nimi spojení, jakousi obdobu jednoduchých senzitivních zakončení. Tím je dána citlivost dentinu na vnější podněty, jako jsou mechanické, tepelné, chemické a elektrické dráždění.

Matrix secernovaná odontoblasty není zpočátku mineralizována a označujeme ji jako predentin. Mineralizace dentinu je zahájena až výskytem tzv. matrixových vezikulů, obsahujících jemné krystaly hydroxyapatitu, které rostou a fungují jako krystalizační jádra pro další ukládání minerálů na kolagenních vláknech. Poněkud odlišným typem je tzv. interglobulární dentin, který vzniká neúplnou kalcifikací základní hmoty, takže zde mezi mineralizačními ložisky (kalkoglobulemi) přetrvávají okrsky nemineralizované matrix. Oblast interglobulárního dentinu se nachází pod sklovinou.



Obr. 10 - Mikrofotografie řezu vyvíjejícím se zubem (Junqueira 1999, zvětšení 350x)

Dentin dělíme podle způsobu a příčiny vzniku na 3 typy:

1. primární – vytváří se v období vývoje zubu, kdy je jeho přírůstek poměrně rychlý a formuje tak dřevnou dutinu
2. sekundární – je produkován v době, kdy je zub již funkčně zatěžován (tj. od dotvoření kořene zubu po celou existenci vitálního zubu), přirůstá pomaleji než primární dentin, takže zmenšování dřevné dutiny probíhá již jen minimálně
3. terciární (iregulární, reparativní) – tvoří se jako ochrana zubní dřevě v místě jejího dráždění, např. hlubokým zubním kazem; je-li jeho tvorba pomalá, nelze jej odlišit od běžného dentinu, ale probíhá-li tvorba rychle, má tento typ dentinu výrazně nepravidelnou strukturu

Oproti kostní tkáni, je dentin zachován jako mineralizovaná tkáň i dlouho po zániku odontoblastů. Této schopnosti je běžně využíváno ve stomatologické praxi, kdy je možné zachovat zub i přesto, že jeho pulpa a odontoblasty byly zničeny infekcí.

### 2.5.2. Sklovina (substantia adamantina, email)

Jak již bylo řečeno, je sklovina nejtvrdějším materiálem lidského těla a je rovněž nejbohatší na vápník. Z 95% je tvořena solemi kalcia (především hydroxyapatitu), z 0,5% je tvořena organickou hmotou (hlavně proteiny – enamelin, amelogenin, kreatin) a zbytek připadá na vodu.

Email vzniká činností buněk ektodermálního původu, označovanými jako ameloblasty. Tyto vysoké cylindrické buňky obsahují velké množství mitochondrií a drsného endoplazmatického retikula a dobře vyvinutý Golgiho komplex. Každý ameloblast nese apikální výběžek zvaný Tomesův, který obsahuje četná sekreční granula. V granulech je uložen protein, tvořící organickou sklovinou matrix, jsou to především amelogeniny a enameliny, jejichž úloha spočívá pravděpodobně v organizaci minerálních komponent skloviny. Sklovina je po celé své tloušťce tvořena sloupci hydroxyapatitu, označovaných jako sklovinná prizmata, která mají tvar klíčové dírky nebo podkovy a jsou k sobě vázána interprizmatickým emailem. Na povrchu skloviny vzniká, jako poslední produkt ameloblastů, tenká vrstvička prizmatické skloviny tzv. primární kutikula. Povrch skloviny dále kryje blanka z organické hmoty cuticula dentis (Nasmythova membrána), která vzniká při prořezávání zubu splnutím primární a sekundární kutikuly (zbytků redukovaného sklovinného epitelu). Cuticula dentis chybí na kousacích plochách a velmi snadno se obroušuje, proto časem zůstává jen na krčku. Zde zredukovaný sklovinný epitel srůstá s epitelem gingivy a vytváří těsnící epitelovou manžetu neboli gingivodentální uzávěru.

Na dentinosklovinné hranici přecházejí svazečky krystalů hydroxyapatitu z jedné tkáně do druhé a tím ještě více zesilují pevné spojení. Rovněž jsou zde vytvořeny typické otisky sklovinných prizmat v dentinu, tzv. imprese.

Nejsilnější sklovinu nacházíme na kousacích plochách až 2,5 mm a nejtenčí v oblasti krčku zubu, jen 0,1 mm (Mazurová 2004).

### 2.5.3. Zubní dřeň (pulpa dentis)

Základním významem zubní dřene je zajištění vitality zubu, tedy zajištění výživy, inervace a ochrany proti cizorodým a infekčním činitelům.



Zubní dřeň vyplňuje dřeňovou dutinu, která prostupuje celým zubem. Nejširší je dutina v korunce, zde vybíhá ve výběžky (cornua pulpae), a odtud pokračuje směrem dolů jako kořenový kanálek až k apexu kořene, kde vyústí jako foramen apicis dentis. Z kořenového kanálku vybíhají místy i akcesorní kanálky, které obvykle i samostatně ústí na povrch. Tento jev má význam především klinický, protože přispívá ke snazšímu a rychlejšímu vstupu a šíření infekce z periodontia do pulpy a naopak. S věkem se dřeňová dutina zužuje, především kvůli nárůstu sekundárního dentinu, dále se redukují rohy dřeně a zužuje se vyústění kořenového kanálku. Jeho případné úplné uzavření by způsobilo zástavu průtoku krve, nekrózu pulpy a tím odumření zubu.

Dřeň zubu je složena z řídkého rosolovitého vaziva a obecně ji lze rozdělit na buněčnou část a matrix. Buněčnou složku představují fibroblasty (pulpocyty), odontoblasty a bloudivé buňky. Matrix je tvořena retikulárními a kolagenními vlákny a velkým množstvím amorfní hmoty. Mikroskopická struktura pulpy se mění s věkem a to tak, že přibývá kolagenních vláken a ubývá amorfní hmoty, vazivo se tak stává hustším. Zubní dřeň dělíme na zevní a vnitřní vrstvu. Zevní vrstvu ještě dále diferencujeme na tzv. Weilovu zónu (stratum subodontoblasticum) a na část tvořenou bipolárními buňkami (fibroblasty). Vnitřní vrstva obsahuje hvězdicovité fibroblasty, bloudivé buňky (to jsou např. histiocyty, lymfocyty, plasmatické buňky či nediferencované buňky) a vlákna retikulární a kolagenní (Mazurová 2004).

Cévní zásobení je zajištěno 2 – 10 malými arterioly, které vstupují do pulpy přes foramen apicis dentis z periodontia a v oblasti korunky na úrovni Weilovy zóny vytvářejí bohatou pletěň, tzv. subodontoblastický kapilární plexus, zasahující až mezi odontoblasty. Odtok krve se děje přes venuly do 1 či více menších žil a opět přes kořenový kanálek do žil periodontia. Inervace je zajištěna myelinizovanými vlákny, které ztrácejí myelinovou pochvu před vstupem do Weilovy zóny a dále vlákna nemyelinizovanými vazomotorickými. Nervová vlákna ztrácející myelinovou pochvu pronikají částečně až do dentinových kanálků. Tato vlákna jsou velmi citlivá na bolest (Junqueira 1999).

## 2.5.4. Pomocné struktury zubu

Jedná se o struktury podílející se na fixaci zubu v čelistech a jsou to dáseň, alveolus, cement a periodontium (tzv. periodontální ligamenta, ozubice). Tento závěsný aparát je souhrnně označován jako parodont.

Jeho funkce spočívá v zavěšení zubu v alveolu a vyrovnávání sil, které na něj působí, především při kousání. Dále chrání cévy a nervy, vstupující do zubu přes foramen apicis dentis, před stlačením. Je také zdrojem nediferencovaných buněk, které se (po dokončení diferenciaci) podílejí na obnově a přestavbě periodontia a alveolární kosti. Při déletrvajících změnách zatížení zubu, dochází k přestavbě periodontia i alveolu, a tím ke změnám v postavení zubů (Mazurová 2004). Této plasticity alveolární kosti se využívá v ortodoncii.

### 2.5.4.1. Cement (substantia ossea)

Tato mineralizovaná tkáň pokrývá vnější povrch kořene, kde kryje vyústění dentinových kanálků. Funkce cementové vrstvy spočívá v ukotvení periodontálních Sharpeyových ligament, a proto je také součástí parodontu.

Ploušťka cementové vrstvy je vysoce variabilní, u dospělých jedinců může dosahovat 100 – 200  $\mu\text{m}$  ve střední části kořene a až 500 – 600  $\mu\text{m}$  na apexu kořene. Ploušťka cementové vrstvy roste s věkem, proto mají neprořezané zuby mladých jedinců vrstvu pouze okolo 10 – 20  $\mu\text{m}$  silnou.

Cement má, stejně jako dentin, strukturu podobnou kosti, a je tak možné rozlišit buněčnou složku a mezibuněčnou hmotu.

Buněčná složka je představována cementoblasty a cementocyty. Cementoblasty jsou uloženy mezi periodontálními ligamenty blízko vyvíjejícího se povrchu precementu. Mají různou velikost, tvar a orientaci, ale na svém povrchu vždy mají malé paprskovité výběžky směřující k cementu. Produkují nemineralizovanou matrix – cementoid (jedná se o kolagenní vlákna a amorfní hmotu), která je postupně po vrstvách mineralizována, a dává tak vzniknout acelulárnímu cementu. Cementocyty jsou v podstatě cementoblasty, které byly zavzaty do tvořící se precementové matrix a jsou uloženy v dutinkách neboli lakunách. Mají výběžky směřující převážně k povrchu cementu, odkud čerpají živiny. Buněčné výběžky procházejí skrze canaliculi, které

nepravidelně procházejí cementem a místy vstupují do sousedních lakun. Cementocyty, uložené hlouběji pod povrchem cementu, jsou stále méně vyživovány a stávají se tak méně aktivní, nejhluběji uložené lakuny již obsahují pouze neživé cementocyty. Do buněčné složky cementu lze zahrnout také fibroblasty, které jsou zodpovědné za tvorbu a resorpci kolagenních vláken periodontálních ligament (Hillson 1996), a déle odontoklasty resorbující cement a dentin kořene (obdobně jako osteoklasty v kostní tkáni).

Mezibuněčnou hmotu cementu lze dále rozdělit na organickou matrix a minerální složku. Organická matrix představuje 24 – 26 % cementu a je tvořena převážně kolagenními vlákny dvou typů. Kolagenní vlákna typu I (vnější) pocházejí z periodontálních ligament. Mají různou velikost i tvar, ale společným znakem je jejich typicky kulatý až oválný tvar na průřezu. V průměru mají 6 – 12  $\mu\text{m}$  a pronikají do cementu pod velkým úhlem. Kolagenní vlákna typu II (vnitřní) jsou produkována cementoblasty a leží rovnoběžně s tvořícím se povrchem precementu. Vlákna jsou malá s průměrem 1 – 2  $\mu\text{m}$  a vyskytují se převážně v kombinaci s vlákny typu I. Nekolagenní složka organické matrix cementu je označována jako základní hmota (stejně jako u dentinu či kosti), je amorfni, ale barvitelná různými kyselými histologickými barvivy. Minerální složku cementu tvoří krystaly hydroxyapatitu a kalcifikují mezibuněčnou hmotu i kolagenní vlákna.

Kolagenní vlákna v periodontálních ligamentech mají velmi rychlou obměnu, která je reakcí na dynamické změny v mechanických silách periodontia. Spojení kolagenních vláken s kořenem zubu se neustále mění, proto je cement tvořen a ukládán v průběhu celého života.

Kořenový cement je klasifikován na tři typy, a sice podle složek, jež obsahuje. Může, ale nemusí obsahovat cementocyty a kolagenní vlákna, a to jak vnitřní (typ II), tak vnější (typ I) nebo jejich kombinaci (Bosshardt 1997):

- acelulární afibrilární cement
- acelulární cement s vnějšími kolagenními vlákny
- celulární cement s vnitřními kolagenními vlákny

Acelulární fibrilární cement (acellular afibrillar cementum) pokrývá malou oblast skloviny podél cemento-sklovinné hranice. Je tvořen mineralizovanou matrix a neobsahuje žádná kolagenní vlákna, což napovídá, že se nijak neúčastní spojení s ligamenty parodontu.

Acelulární cement s vnějšími kolagenními vlákny (acellular extrinsic fiber cementum = AEFC) se nachází převážně na cervikální a střední části kořene. U frontálních zubů může pokrývat také apikální část kořene. Slouží jako kotva zubu v alveolární dutině. AEFC podstupuje aposiční růst vedoucí ke vzniku vrstvy střídajících se tmavých a světlých pruhů, viditelných na histologických řezech (Kagerer 2001).

Celulární cement s vnitřními kolagenními vlákny (cellular intrinsic fiber cementum) zpočátku se ukládá na povrchu kořene v místech, kde není vytvořen AEFC, což se může vyskytnout v apikální části a v místě furkace kořenů. Tento typ cementu přerůstá vrstvy AEFC a naopak a vytvářejí smíšený cement, označovaný jako celulární smíšený vrstevnatý cement (cellular mixed stratified cementum).

Další podobností kostní tkáň a cementu, je jeho reakce na mechanickou zátěž. Cement může být remodelován společnou činností odontoklastů (zajišťujících resorpci) a cementoblastů (produkujících novou cementovou tkáň), v závislosti na povaze zátěže. Stálá tvorba cementu kompenzuje růstové změny, kterými zub normálně prochází. U některých jedinců se však zuby vyznačují masivní nadprodukcí cementu, známou jako hypercementosis (Hillson 1996). Jejím důsledkem jsou zduřelé a nepravidelně vypouklé kořeny. Pokud se tato porucha objeví u několika kořenů vícekořenových zubů, může dojít až k jejich spojení do jedolité masy. Příčina tohoto defektu je neznámá, ale je nepravděpodobné, že by souvisela s nadměrným opotřebením nebo okluzí zubů, protože hypercementosis byla pozorována také u neprořezaných zubů.

Cement neobsahuje nervy ani cévy, výživa probíhá difúzí z cév periodontia.

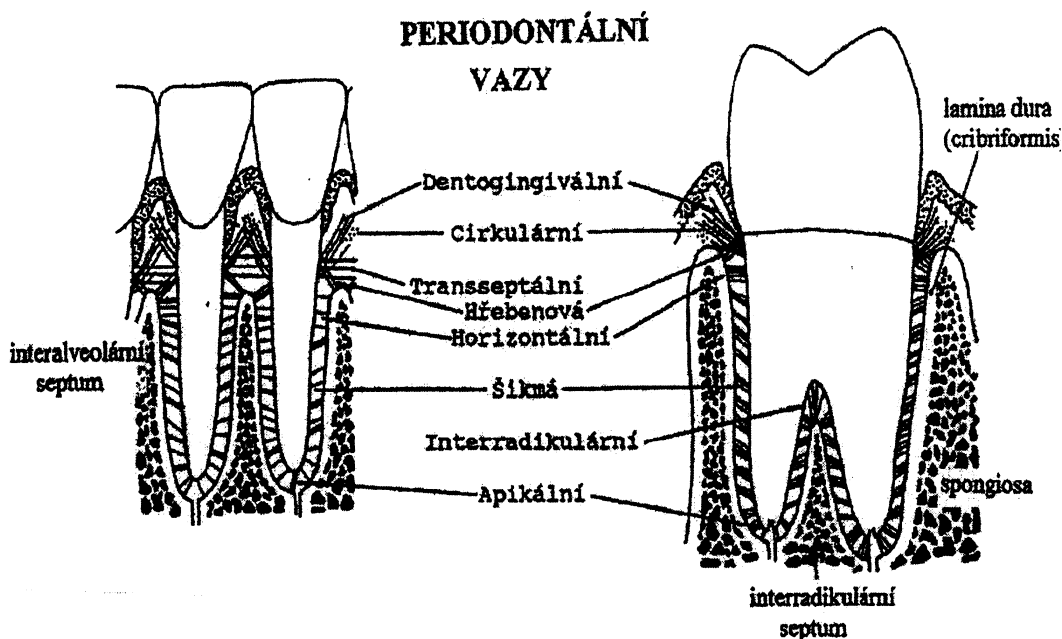
#### 2.5.4.2. Periodontální ligamenta (periodontium, periodont)

Periodontální vazy (Sharpeyovy vazy) jsou tvořeny speciální hustou vazivovou tkání a je možné je rozdělit na dvě skupiny. První skupina se nazývá gingivální a řadíme do ní vazy sloužící k upevnění gingivy k zubu v oblasti krčku. Konkrétně to jsou vlákna dentogingivální (volná či ukotvená), která jdou radiálně z cementu krčku zubu do volné a připoutané gingivy. Dále vlákna cirkulární, obkružující krček zubu a ležící ve volné gingivě. A poslední jsou transseptální vlákna, spojující krčky sousedních zubů. Druhá skupina je dentoalveolární a zahrnuje vazy probíhající z cementu kořene zubu do alveolární kosti. Jedná se o vlákna hřebenová, horizontální, šikmá, apikální, případně také interradiální. Součástí závěsného aparátu zubu jsou rovněž malé intersticiální

prostory mezi vazy. Jsou vyplněny řídkým kolagenním vazivem a velkým množstvím mezibuněčné hmoty a nediferencovaných mezenchymových (progenitorových) buněk, které se podle potřeby diferencují v osteoblasty či osteoklasty (Mazurová 2004). V malém množství se zde nacházejí také histiocyty, lymfocyty a plazmatické buňky. V dospělosti jsou zde patrná i tzv. intermediární vlákna, jež se upínají pouze na jedné straně, buď do cementu nebo do alveolu, a pravděpodobně fungují jako zásobní vlákna, zapojující se pouze do přestavby periodontia při změnách funkčních požadavcích.

Díky tomuto poměrně složitému závěsnému systému je zubu dovolen jen minimální pohyb. Navíc jsou vlákna periodontu uspořádána tak, aby podporovala síly vznikající při žvýkání.

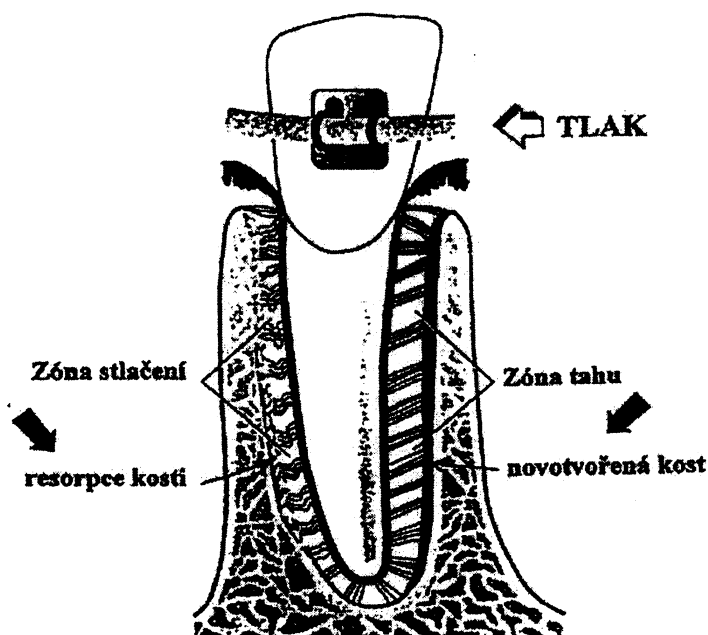
Kolagen periodontálních ligament má rychlou obměnu proteinů a velký podíl rozpustného kolagenu, což má svá rizika. Faktory, které ovlivňují syntézu proteinů a kolagenu, jako jsou např. nedostatek bílkovin nebo vitamínu C (tzv. kurděje), vedou k atrofii periodontálních vazů. Důsledkem je uvolňování zubů v alveolech a v krajním případě i jeho vypadnutí. Této plasticity periodontu je využíváno v ortodontických zákrocích, kdy lze dosáhnout zásadní změny v postavení zubů v čelisti.



Obr. 11 – Typy periodonálních vazů (Mazurová 2004)

### 2.5.4.3. Alveolus (zubní lůžko)

Alveolární kost je v neustálém kontaktu s periodontálními vazy. Na povrchu je tvořena kompaktní kostí (fibrilární kostí nezralého typu) a uvnitř spongiosou. Vnitřní povrch lůžka je lemován ploténkou kosti, do které se upínají periodontální vazy. Alveolární kost má velkou schopnost přestavby, čehož se hojně využívá v ortodoncii. Jednotlivé alveoly jsou odděleny interalveolárními septy, u vícekořenových zubů vyrůstají ze dna alveolu mezikořenová septa (Mazurová 2004).



Obr. 12 - Obrázek přestavby alveolární kosti (Mazurová 2004)

### 2.5.4.4. Dáseň (gingiva) a gingivodentální uzávěra

Dáseň je sliznice dutiny ústní, která kryje povrch alveolárního výběžku a je pevně uchycená k periostu čelistí. Dáseň tvoří vrstevnatý dlaždicový epitel a četné vazivové papily.

Gingivodentální uzávěra je pevné spojení epitelu gingivy se sklovinou nebo cementem v oblasti krčku zubu. Epitel je připevněn k zubní sklovině díky kutikule, která připomíná zesílenou bazální laminu a vytváří tzv. Gottliebův epitelový úpon. Mezi

epitelem a sklovinou je vytvořen gingivální žlábek (sulcus) a ve formě mělké brázdičky obkružuje korunku.

Funkcí uzávěry je bránit pronikání slin, toxinů, bakterií, částic potravy atd. z gingiválního žlábků do periodontia. Poškození tohoto spojení (mechanické nebo infekcí), může vést k zánětu dásně až periodontia a v krajním případě, skončit vypadnutím zubu. Také často dochází k procesu tzv. gingivální recese, což je sestup epitelové manžety a následné obnažení krčku (Mazurová 2004).

## 2.6. ZNAČENÍ ZUBŮ

Existuje několik způsobů značení zubů. Základem je však rozdělení chrupu na 4 kvadranty, přičemž hranicemi mezi nimi jsou rovina okluze a rovina sagitální.

Asi nejjednodušším způsobem značení je použití zubního schématu tzv. zubního kříže, kdy vycházíme z představy, že pacient je obrácen čelem k nám a zuby jeho pravé poloviny chrupu jsou zapisovány do zubního schématu vlevo a naopak.

pravý horní kvadrant	levý horní kvadrant
pravý dolní kvadrant	levý dolní kvadrant

Nejpoužívanější formou značení zubů, která je také doporučována WHO, je dvojčíselný FDI systém (tzv. two-digit systém). Jedná se o dvojčíselné značení každého zubu, kde první číslo označuje kvadrant, u stálého chrupu čísla 1 – 4, u dočasného chrupu 5 – 8, a druhé uvádí číslo příslušného zubu.

př.:

1	2
4	3

16 = stálý horní pravý první molár

38 = stálý dolní levý třetí molár

Zuby stálého chrupu se značí pomocí arabských číslic:

1 = mesiální řezák

2 = laterální řezák

3 = špičák

4 = první premolár

5 = druhý premolár

6 = první molár

7 = druhý molár

8 = třetí molár



Ke značení zubů se používá také písmenná forma v kombinaci s číslem. Písmeno značí typ zubu a číslo udává jeho pozici (pořadí) v rámci daného typu. U dočasné dentice se používají malá písmena (i, c, m) u trvalé dentice velká písmena (I, C, P, M) a doplní se orientace. Lze použít také index př.: dolní levý M1 = levý M<sub>1</sub> .

Trvalá dentice:

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

C = dentes canini = špičáky.....C

P = dentes praemolares = premoláry (zuby třenové) .....P1, P2

M = dentes molares = moláry (stoličky) .....M1, M2, M3

Dočasná dentice:

i = řezáky.....i1, i2

c = špičáky.....c

m = moláry.....m1, m2

Pro zuby dočasné dentice lze použít také římské číslice:

I = i1

II = i2

III = c

IV = m1

V = m2

## 2.7. METODICKÝ POSTUP HISTOLOGICKÉHO ZPRACOVÁNÍ TVRDÝCH TKÁNÍ

Metoda odhadu věku na základě aposičních linií cementu na kořeni zubu, je stanovením histologickým, proto se i metodický postup shoduje s klasickými postupy zpracovávání tvrdých tkání. Těmito klasickými postupy jsou demineralizace, tedy zbavení tkáně velkého množství minerálních solí, jež obsahují, dále technika výbrusu (Wolf 1940) a v neposlední řadě přímé krájení nedemineralizované tvrdé tkáně pomocí diamantových nožů. Mezi tvrdé tkáně patří kromě zubů také kosti, kostní nádory nebo zvápenatělé vazivo.

### 2.7.1. Demineralizace (dekalifikace, odvápnování)

Z minerálních solí, které tvrdé tkáně ve velkém množství obsahují, se nejčastěji jedná o soli vápenaté, proto termín dekalifikace.

Odvápnění spočívá v rozpuštění minerálních solí účinkem zředěných kyselin, které převedou nerozpustné soli v soli rozpustné ve vodě a přejdou tak do roztoku (Vacek 1988).

Při odvápnování tkáně je důležité dodržet několik pravidel:

- tkáň musí být fixována, protože při nedostatečné fixaci může dojít k poškození tkáně dekalifikační tekutinou
- důkladné vyprání tkáně po fixaci v etanolu nebo ve vodě, záleží na druhu fixační tekutiny
- odvápnění tkáně musí být rychlé, je proto nutné použít dostatečné množství dekalifikační tekutiny, která je pravidelně, nejméně jednou denně vyměňována
- dokonalé odstranění dekalifikační tekutiny z tkáně vypráním v roztoku anorganické soli nebo ve vodě, podle typu dekalifikační tekutiny

Fixace tkáně je rychlá denaturace cytoplazmatických bílkovin buněk a tkání, které zabrání autolýze tkáně, ale je zároveň šetrná a zachovávající strukturu tkáně co nejvíce podobnou struktuře živé tkáně. Ideální fixační prostředek, který by strukturu tkáně vůbec neovlivňoval není znám. Během fixace vždy dochází ke strukturním změnám, jako jsou smrštění tkáně nebo vznik různých artefaktů. Fixace rovněž nesmí

porušovat barvitelnost tkáně. Fixační tekutina musí do tkáně pronikat rychle, aby došlo k rovnoměrnému profixování celého tkáňového vzorku. Používané fixační prostředky lze rozdělit na chemické a fyzikální. Nejčastěji používaným chemickým fixativem je 10% nebo 20 % formol (formalín) připravovaný ředěním 40 % formaldehydu. Tkáň se ve formolu fixuje 24 – 44 hodin, samozřejmě záleží na velikosti tkáňového bločku, ale může trvat i déle, aniž by došlo k přefixování. Formol do tkáně proniká rychle, dobře zachovává barvitelnost tkáně a výborně konzervuje. Určitou nevýhodou je možnost způsobení zbotnění tkáně (Vacek 1988). Po fixaci se tkáň přenáší buď přímo do 70 % etanolu nebo se propírá 2 – 4 hodiny v tekoucí vodě.

Doba trvání dekalifikace je různá a závisí především na velikosti tkáňového bločku a na druhu dekalifikační tekutiny. Správný stupeň odvápnění poznáme nejlépe naříznutím tkáně skalpelem nebo vbodnutím preparační jehly. Odvápněnou tkáň lze krájet na zmrazovacím mikrotomu (kryomikrotomu) nebo po zalití do vhodného zalévacího média na rotačním či sáňkovém mikrotomu. Tkáň zalitou do parafinu je nutné před vlastním barvením odparafinovat.

K dekalifikaci tvrdé tkáně se nejčastěji používají 5 % kyselina dusičná, 5 % kyselina trichloroctová, kyselina mravenčí nebo EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina, Chelaton III) či její soli. Odvápnění kyselinami je poměrně rychlé, nevýhodou však je silná kyselost dekalifikační tekutiny, která může způsobit, při delším odvápnění, snížení barvitelnosti tkáně, hlavně buněčných jader. Tato nevýhoda odpadá při dekalifikaci prostřednictvím EDTA, jehož podstatou je schopnost vázat kalcium a magnézium v podobě vysoce rozpustných komplexních solí. Nejlépe se hodí Chelaton III (Vacek 1988), jeho použití je k tkáni šetrné a zůstává zachována také barvitelnost tkáně. Doba odvápnění s použitím EDTA se odvíjí od typu tkáně a v případě zubní tkáně se pohybuje v rozmezí několika týdnů. Po skončení odvápnění je nutné tkáň vyprat v tekoucí vodě po dobu 24 hodin.

### 2.7.2. Zhotovování výbrusů

Výbrusy jsou tenké ploténky z tvrdé tkáně zhotovené postupným vybrušováním. Přípravují se z materiálu čerstvého i fixovaného a postup je poměrně jednoduchý.

Z tvrdé nedekalcifikované tkáně se vyřízne pilkou nebo brusným kotoučkem tenká ploténka o síle několika milimetrů, která se postupně brousí na stále jemnějších

brusných papírech, nakonec s použitím brusných past, až na výslednou velmi tenkou ploténku silnou cca 30  $\mu\text{m}$ . Ploténky se při broušení svlažují vodou a k brusnému papíru se přitlačují prstem či jinou pomůckou, např. korkovou zátkou. Tloušťku výbrusu je možné kontrolovat posuvným měřidlem.

Tenké výbrusy při broušení praskají, proto je dobré je před samotným vybrušováním zalít do umělé pryskyřice, lze použít např.: metylmetakrylová pryskyřice – dentacryl, epoxidové pryskyřice – epon, biodur. Pryskyřice biodur, vytvořená Von Hagensem (1979), je nejvhodnějším médiem, protože vytváří minimum artefaktů. Zato zalévání touto pryskyřicí, je v porovnání s jinými médii časově náročnějším procesem (Schultz 2001).

Výsledné výbrusy je možné barvit histologickými barvivy. Toto barvení se provádí z důvodů kvalitnějšího odlišení jednotlivých struktur při pozorování v mikroskopu. Princip barvení spočívá ve specifickém navázání histologického barviva jen na určité složky buněk nebo extracelulární matrix. Pro obarvení preparátů je možné použít celou řadu kyselých a bazických barviv, např. eosin, což je syntetické kyselé barvivo, který specificky barví jen bazické části buněk, tedy cytoplazmatické proteiny a výsledkem je červené zbarvení. Dále hematoxylin, jako bazické barvivo barví nukleoproteiny modrofialově. Lze použít také toluidinovou modř nebo alizarinovou červen. Barviva jsou rozpustná ve vodě nebo v etanolu, proto je nezbytné výbrus převést do stejného rozpustidla, samozřejmě až po odstranění zalévacího média, ve kterém je výbrus zalit.

### 3. METODIKA A MATERIÁL

#### 3.1. METODIKA

V předkládané diplomové práci byly vyzkoušeny oba metodické postupy zhotovování histologických preparátů z lidských zubů. Byla zkoušena jak metoda zhotovování výbrusů zubů v kombinaci s různými druhy histologických barviv, tak metoda dekalifikace zubní tkáně a její následné zalití do parafínu podobného zalévacího média – Paraplastu X-TRA<sup>®</sup>.

V rámci přípravné fáze diplomové práce, byly obě metody testovány na několika zkušebních vzorcích, nezahrnutých ve vyšetřovaném souboru, a následně srovnávány z různých hledisek (kvalita výsledných preparátů, praktičnost metody, technická a časová náročnost, atd.). Na základě těchto výsledků byla vybrána ta metodika, která se jevila jako vhodnější pro vyšetřovaný soubor.

##### 3.1.1. Metodika zhotovování výbrusů

Vypracovaný postup byl rozdělen do následujících 6 etap:

###### 1) Fixace tkáně

K fixaci zubů bylo použito 10 % formolu po dobu 48 hodin, aby byla zajištěna dostatečná fixace celého zubu. Poté byly vzorky prány 4 hodiny v tekoucí vodě a následně sušeny při pokojové teplotě.

###### 2) Zalití zubu do pryskyřice

Fixované a usušené zuby byly jednotlivě umístěny do zalévacích komůrek a zality metylmetakrylovou pryskyřicí dentacrylem, připraveným v poměru 3 díly tekutého monomeru a 1 dílu práškového polymeru. Uvedený poměr složek napomáhá eliminaci vzduchových bublin vzniklých při zalévání z důvodů vyšší tekutosti pryskyřice. Během polymerační reakce dochází k zahřívání celého bločku pryskyřice a jeho postupnému tvrdnutí, celý proces trvá přibližně 2 hodiny.

### 3) Zhotovení výbrusu

Z vytvrzených bločků pryskyřice byly brusným kotoučkem vyříznuty cca 3 mm silné ploténky kořene zubu tak, aby obsahovaly rovinu procházející 1/3 kořene. Získané segmenty byly poté broušeny, po obou stranách, brusným papírem o stále menší zrnitosti, v posledních fázích broušení byly výbrusy oplachovány vodou, dokud nebylo docíleno požadované síly výbrusu okolo 30 µm. Tloušťka výbrusů byla kontrolována posuvným měřidlem.

### 4) Odstranění zalévacího média

Odstranění dentacrylu bylo provedeno ponořením výbrusů do acetonové lázně po dobu 1 hodiny, a následně krátkým opláchnutím v čistém acetonu. Poté byly výbrusy převedeny sestupnou etanolovou řadou do vody. Koncentrace etanolů v sestupné etanolové řadě a doba jejich působení jsou uvedeny v následující tabulce 3.

konc. etanolu	doba působení (v minutách)
99,8 %	10
96 %	10
H <sub>2</sub> O	10

Tab. 3 - Sestupná etanolová řada (Vacek 1988)

### 5) Barvení

Barvení jednoho preparátu bylo provedeno vodným roztokem eosinu po dobu 5 minut až bylo docíleno červeného zbarvení. Další preparát byl barven vodným roztokem hematoxylinu po dobu 5 minut a výsledkem bylo modrofialové zbarvení.

### 6) Zamontování

Obarvené preparáty byl zamontovány do Kanadského balzámu.

### 3.1.2. Metodika dekalifikace a zalévání do Paraplastu X-TRA®

Jako zalévací médium pro dekalifikovanou tvrdou zubní tkáň byl místo běžného parafínu zvolen zkvalitněný parafín s označením Paraplast X-TRA® (dále jen Paraplast).

Vypracovaný postup byl shrnut do 11 etap:

#### 1) Příprava vzorků

Z extrahovaných zubů byly pomocí brusného kotoučku odříznuty apikální poloviny kořene, obsahující úsek 15 – 45% vzdálenosti od vrcholu kořene a pouze s nimi bylo dále pracováno.

#### 2) Fixace tkáně

Odříznuté úseky kořenů zubů byly fixovány v 10 % formolu po dobu min. 48 hodin, aby byla zajištěna úplná fixace tvrdé zubní tkáně. Poté byly zubní kořeny důkladně, minimálně 4 hodiny, vyprány pod tekoucí vodou.

#### 3) Dekalifikace

Fixované kořeny byly převedeny do 10 % vodného roztoku EDTA Na<sub>2</sub> (Chelaton III) a ponechány při pokojové teplotě. Dekalifikační roztok byl pravidelně, jednou denně měněn a celý proces demineralizace trval v průměru 6 – 8 týdnů, v závislosti na velikosti vzorku. Stupeň dekalifikace byl testován vbodnutím preparační jehly. Po ukončení dekalifikace, byly vzorky důkladně vyprány v tekoucí vodě po dobu 24 hodin.

#### 4) Odvodnění vzorků vzestupnou etanolovou řadou

Odvodnění dekalifikované zubní tkáně bylo provedeno řadou etanolů o stoupající koncentraci. Stoupající koncentrace etanolů a doba působení jsou uvedeny v následující tabulce 4.

konc. etanolu	doba působení (v hodinách)
70 %	2
80 %	4
96 %	6
96 %	2
96 %	2

Tab. 4 – Vzestupná etanolová řada (Vacek 1988)

5) Prosycení tkáně látkou rozpouštějící Paraplast

Prosycení tkáně bylo docíleno převedením vzorků do tří po sobě jdoucích lázní xylenu, každá po dobu 15 minut.

6) Prosycení tkáně Paraplastem

Z poslední xylenevé lázně byly vzorky rychle přeneseny přímo do kádinky s rozpuštěným 100 % Paraplastem a bez zakrytí (z důvodu možnosti těkání xylenevých par ze vzorků) umístěny na 4 hodiny v termostatu vyhřátém na 60°C. Paraplastové lázně byly opakovány 3x po sobě, vždy s novým 100 % Paraplastem, přičemž druhá lázeň trvala 6 hodin a ve třetí, poslední lázni byly vzorky ponechány přes noc, aby došlo k řádnému odstranění xylenu z tkáně a jeho náhradě Paraplastem. To vše v termostatu při 60 °C.

7) Zalítí vzorků

K vlastnímu zalítí vzorků byl použit čistý rozpuštěný 100 % Paraplast. Do označených zalévacích komůrek, složených z hliníkové fólie, byl nalit rozpuštěný Paraplast a do něho byly rychle pinzetou přeneseny jednotlivé vzorky, pomocí preparační jehly byla upravena jejich pozice a poté byly zality. Takto zhotovené paraplastové bločky byly nechány tuhnout při pokojové teplotě.

8) Krájení tkáňových bločků

Ztuhlé tkáňové bločky byly krájeny na tenké příčné řezy o síle cca 10 - 15 µm na sáňkovém mikrotomu Meopta s automatickým posunem s použitím



mikrotomových žiletek N35 Feather. Příčné řezy zubů byly zhotovovány směrem apikálním. Z každého vzorku bylo zhotoveno několik sériových řezů a přes vodní hladinu byly napínány na označená podložní sklíčka.

#### 9) Odstranění zalévacího média

Odstranění Paraplastu z histologických řezů bylo provedeno pomocí dvou po sobě jdoucích xylenových lázní, každá po dobu 5 minut.

#### 10) Zavodnění vzorků sestupnou etanolovou řadou

Podložní sklíčka s řezy byla z xylenové lázně převedena sestupnou etanolovou řadou do vody. Koncentrace a dobu působení sestupné etanolové řady ukazuje následující tabulka 5.

konc. etanolu	doba působení (v minutách)
99,8 %	5
96 %	5
H <sub>2</sub> O	5

Tab. 5 – Sestupná etanolová řada (Vacek 1988)

#### 11) Barvení

Histologické řezy byly barveny 1 % vodným roztokem Alizarinové červeně S po dobu 2 minut.

Histologické řezy a výbrusy, zhotovené výše popsány metodami, byly pozorovány ve světelném mikroskopu Jenalumar nejčastěji při přibližně 160násobném zvětšení a fotografovány.

Počítání cementových linií jednotlivých preparátů na zhotovených fotografiích bylo prováděno manuálně v programu Microsoft Photo Editor. Všechny vzorky byly hodnoceny jako slepé, vyšetřovaný jedinec byl na vzorku uveden pouze pod pořadovým číslem.

Ukázalo se, že histologické řezy dekalifikovaných zubních kořenů, v porovnání s výbrusy zubů, jsou pro metodu odečítání cementových aposic výhodnější. Metoda je sice podstatně časově náročnější, ale zato je docíleno kvalitnějších preparátů, které jsou

mnohem tenčí a dovolují tak lepší průchod světla skrze pozorovaný preparát, cementové aposiční linie jsou tak čitelnější a přesněji počitatelné.

Navíc, byl v rámci metody dekalciifikace zubů vyzkoušen alternativní postup krájení dekalciifikovaných zubních kořenů bez zalévání do Paraplastu. Tento postup byl zkoušen na 4 zubech, a to z důvodů odstranění kroků, kdy jsou vzorky po delší dobu vystaveny působení vyšších teplot (okolo 60°C) a působení koncentrovaných chemických látek. Tento alternativní postup se od výše popisovaného lišil v tom, že byly zcela vynechány kroky 4), 5), 6), 7), 9) a 10). Postup se tak zredukoval pouze na fixaci tkáně, dekalciifikaci s následným vypráním tkáně, krájení na mikrotomu a barvení zhotovených řezů. Krájení probíhalo tak, že vzorky kořenů zubů byly vloženy mezi 2 kousky měkké pryže a takto upnuty do neapolské svorky mikrotomu a krájeny. Kvalita zhotovených řezů byla lepší než u vzorků zalitých do Paraplastu. Laboratorní postup a manipulace se vzorky se výrazně zjednodušila a hlavně byl omezen přímý kontakt pracovníka s poměrně nebezpečnými a škodlivými reagensy na minimum.

### 3.1.3 Statistické zpracování

Statistické zpracování výsledků diplomové práce bylo provedeno pomocí programu Statistica verze 6.0. Byla zvolena hladina významnosti  $\alpha = 0,05$  a  $\alpha = 0,01$ .

#### 3.1.3.1. Stanovení míry korelace odhadovaného a skutečného věku jedince

Stanovení míry korelace odhadovaného a chronologického skutečného věku jedince bylo provedeno pomocí korelačního koeficientu ( $r$ ). Testována byla nulová hypotéza, že odhadovaný věk a skutečný věk jedince jsou veličiny navzájem nezávislé.

Korelační koeficient ( $r$ ) lze vypočítat ze vztahu (Zvárová 1998):

$$r = \frac{s_{xy}}{\sqrt{s_x^2 s_y^2}}$$

kde  $s_x^2$  a  $s_y^2$  jsou výběrové rozptyly a  $s_{xy}$  je kovariance, jíž lze vypočítat následovně:

$$s_{xy} = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$$

Směrnici regresní přímky (b) lze vypočítat ze vztahu:

$$b = r \frac{s_y}{s_x}$$

kde  $s_x$  a  $s_y$  jsou směrodatné odchylky veličin  $X$  a  $Y$ .

Absolutní člen regresní rovnice lze vypočítat následovně:

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

kde  $\bar{x}$  a  $\bar{y}$  jsou výběrové průměry:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$$\bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i$$

### 3.1.3.2. Chyba odečtu aposičních cementových linií

Pro vyjádření spolehlivosti odečtu cementových aposičních linií byl použit koeficient reliability (R), který udává míru správné opakovatelnosti měření. Tento koeficient je možno vypočítat s pomocí následujícího vzorce (Šmahel 2001):

$$R = \frac{s_{celk}^2 - s_{ch}^2}{s_{celk}^2}$$

kde  $s_{celk}^2$  je celková variance a  $s_{ch}^2$  je chybový rozptyl daného metrického znaku.

Koeficient reliability by měl dosahovat hodnot vyšších než 0,9. Pokud je jeho hodnota nižší než 0,8, ztrácí měření smysl, protože více jak 20% rozptylu znaku je způsobeno chybou měření.

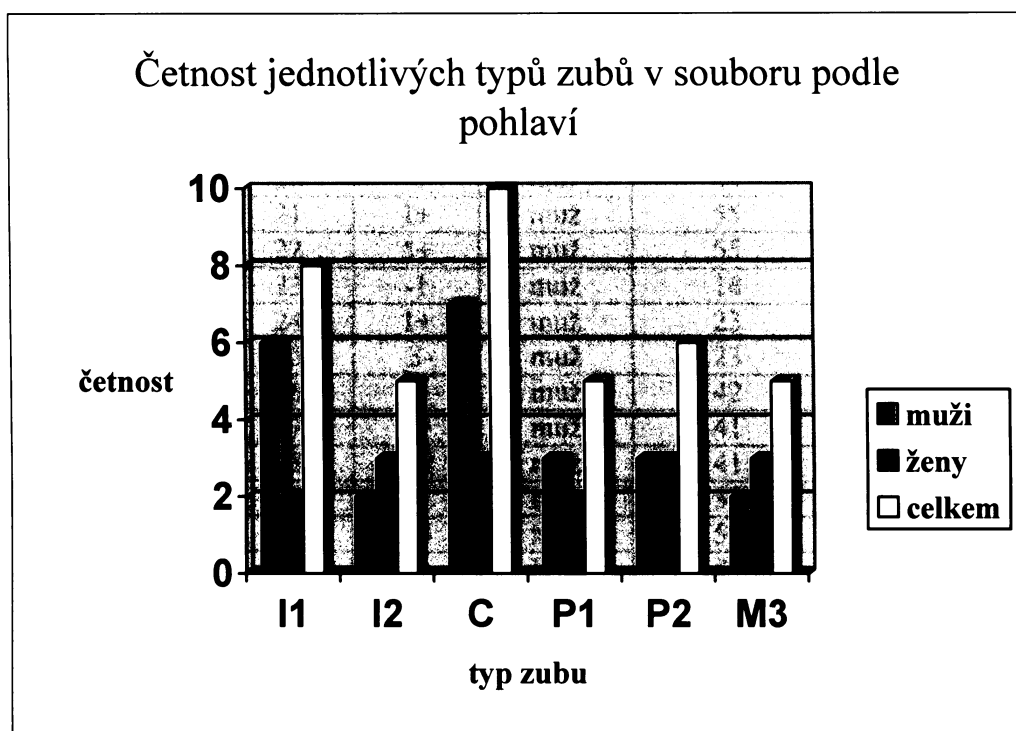
### 3.2. MATERIÁL

V předkládané diplomové práci byl zpracováván recentní soubor 39 extrahovaných lidských zubů permanentní dentice, pocházejících od 35 jedinců různého věku od 14 do 73 let. V souboru bylo obsaženo 15 žen a 20 mužů. Ve čtyřech případech pocházely dva extrahované zuby od jednoho jedince. Vyšetřovaný soubor obsahoval několik typů zubů s různým početním zastoupením podle dostupného materiálu. Složení hodnoceného souboru a četnost zastoupení jednotlivých typů zubů u obou pohlaví je znázorněno v následující tabulce 6 a grafu 1.

typ zubu	četnost zastoupení v souboru		
	muži	ženy	celkem
I1	6	2	8
I2	2	3	5
C	7	3	10
P1	3	2	5
P2	3	3	6
M3	2	3	5
celkem	23	16	39

Tab. 6 – Složení hodnoceného souboru

Primárním zdrojem materiálu byl Ústav soudního lékařství a toxikologie UK 1. LF v Praze (MUDr. Alexander Pilin, CSc.) a dále Soukromé stomatologické praxe v Tachově (MUDr. Báčová) a v Praze (MUDr. Novický).



Graf 1 – Složení hodnoceného souboru podle pohlaví

V následující tabulce 7 jsou uvedeny typ extrahovaného zubu, pohlaví a chronologický věk celého souboru 39 jedinců hodnocených v diplomové práci, označených pořadovými čísly.

pořadové číslo	typ zubu	pohlaví	chronologický věk
1	-4	muž	32
2	+5	žena	26
3	8-	muž	36
4	-8	žena	25
5	+8	žena	26
6	8-	muž	72
7	-5	muž	72
8	+8	žena	34
9	3+	muž	73
10	+3	muž	56
11	-5	žena	58
12	-3	žena	57
13	-5	žena	57
14	-4	muž	73
15	+3	žena	61

pořadové číslo	typ zubu	pohlaví	chronologický věk
16	+2	žena	57
17	-1	žena	57
18	+5	muž	45
19	1-	muž	59
20	-3	muž	44
21	1+	muž	55
22	5+	muž	55
23	-1	muž	14
24	1+	muž	23
25	3-	muž	23
26	-3	muž	42
27	3+	muž	41
28	+1	muž	41
29	-1	muž	38
30	+4	muž	53
31	-4	žena	53
32	+3	žena	39
33	2+	muž	67
34	-3	muž	47
35	1+	žena	61
36	-2	muž	58
37	4-	žena	61
38	-2	žena	53
39	2+	žena	64

Tab. 7 – Soubor jedinců hodnocených v diplomové práci

#### 4. VÝSLEDKY

Z původního souboru 39 vzorků extrahovaných zubů vznikl menší konečný soubor 35 vzorků. Z důvodů nekvalitní čitelnosti cementových aposičních linií na histologických preparátech, byly z původního souboru vyloučeny 4 vzorky (č. 1, 17, 22a a 32).

Následující tabulka 8 ukazuje výsledky, kterých bylo dosaženo. Jednotlivé vzorky jsou označeny pořadovými čísly, dále jsou uvedena čísla vzorků, pod kterými s nimi bylo pracováno a byl prováděn slepý test počítání cementových linií. Tabulka obsahuje typ zubu, průměrný počet zjištěných cementových linií, průměrný věk erupce daného zubu, odhadovaný věk jedince, skutečný chronologický věk jedince, odchylku odhadovaného a skutečného věku jedince v letech a v procentech. Odhadovaný věk jedince byl získán součtem průměrného počtu cementových linií a průměrného věku erupce sledovaného zubu.

pořadové č.	č. vzorku	typ zubu	ø počet linií	ø věk erupce	odhad. věk	skut. věk	odchylka (roky)	odchylka %
1	2	+5	17	11	28	26	2	7,7
2	3	8-	43	19	62	36	26	72,2
3	4	-8	45,7	19	64,7	25	39,7	158,8
4	5	+8	20,8	19	39,8	26	13,8	53,1
5	6a	8-	46,5	19	65,5	72	-6,5	9,0
6	6b	-5	53,8	11,5	65,3	72	-6,7	9,3
7	7	+8	64,5	19	83,5	34	49,5	145,6
8	8	3+	45,4	11,5	56,9	73	-16,1	22,1
9	9	+3	46,3	11,5	57,8	56	1,8	3,2
10	10	-5	40,7	11,5	52,2	58	-5,8	10,0
11	11a	-3	48,5	9,5	58	57	1	1,8
12	11b	-5	43	11,5	54,5	57	-2,5	4,4
13	12	-4	38,6	11	49,6	73	-23,4	32,1
14	13	+3	46,3	11,5	57,8	61	-3,2	5,2
15	14	+2	35	8,5	43,5	57	-13,5	23,7
16	15	-1	54,5	6,5	61	57	4	7,0
17	16	+5	44,9	11	55,9	45	10,9	24,2
18	18	-3	48,6	9,5	58,1	44	14,1	32,0

pořadové č.	č. vzorku	typ zubu	ø počet linií	ø věk erupce	odhad. věk	skut. věk	odchylka (roky)	odchylka %
19	19	1+	47	7,5	54,5	55	-0,5	0,9
20	20	5+	51,5	11	62,5	55	7,5	13,6
21	21	-1	15,8	6,5	22,3	14	8,3	59,3
22	22	3-	22,8	9,5	32,3	23	9,3	40,4
23	23	-3	35,5	9,5	45	42	3	7,1
24	24a	3+	30	11,5	41,5	41	0,5	1,2
25	24b	+1	31,8	7,5	39,3	41	-1,7	4,1
26	25	-1	40,2	6,5	46,7	38	8,7	22,9
27	26	+4	43,6	10,5	54,1	53	1,1	2,1
28	27	-4	43,8	11	54,8	53	1,8	3,4
29	28	+3	24,5	11,5	36	39	-3	7,7
30	29	2+	29,6	8,5	38,1	67	-28,9	43,1
31	30	-3	46,5	9,5	56	47	9	19,1
32	31	1+	47,8	7,5	55,3	61	-5,7	9,3
33	33	4-	37,7	11	48,7	61	-12,3	20,2
34	34	-2	31,5	7,5	39	53	-14	26,4
35	35	2+	54,6	8,5	63,1	64	-0,9	1,4

Tab. 8 – Výsledky dosažené počítáním cementových aposičních linií



## 4.1. STANOVENÍ MÍRY KORELACE

Síla lineární závislosti mezi odhadovaným a skutečným chronologickým věkem jedince byla vyjádřena korelačním koeficientem  $r = 0,418$ . Další statistické veličiny, jako jsou průměrná hodnota a směrodatná odchylka  $s$  odhadovaného a skutečného věku, četnost souboru  $n$ , koeficient determinace  $r^2$ , tedy druhá mocnina korelačního koeficientu, rovněž vyjadřující sílu závislosti daných veličin, jsou uvedeny v následující tabulce 9. Grafické znázornění korelace odhadovaného a skutečného věku jedinců na základě počtu aposičních linií cementové vrstvy kořene je vyjádřeno grafem 2. Na základě  $p$ -hodnoty testu  $0,012384 < 0,05$  bylo dosaženo statistické významnosti. Byla tak prokázána signifikantní závislost sledovaných veličin.

	$\bar{x}$	$s$	$r$	$r^2$	$p$	sv	$n$
odhadovaný věk	51,523	12,369					
skutečný věk	49,6	15,393	0,418	0,175	0,012384 < 0,05	*	35

Tab. 9 – Statistické vyhodnocení souboru  $n = 35$

$\bar{x}$  – průměrná hodnota znaku

$s$  – směrodatná odchylka znaku

$r$  – korelační koeficient

$r^2$  – koeficient determinace

sv – statistická významnost

- statisticky nevýznamné

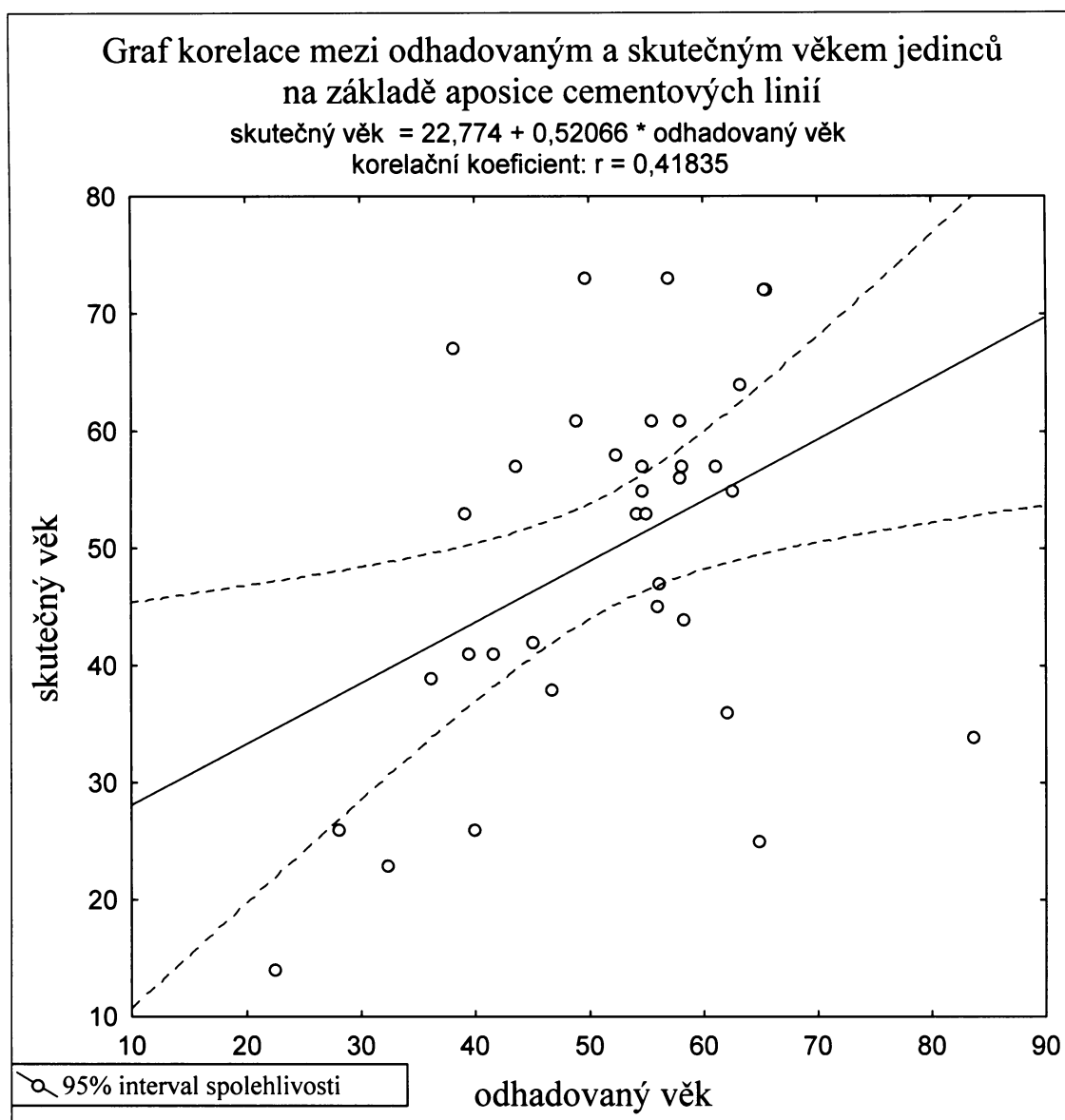
\* statisticky významné na 5% hladině významnosti  $\alpha$

\*\* statisticky významné na 1% hladině významnosti  $\alpha$  (vysoká statistická významnost)

$p$  – dosažená hladina významnosti

$n$  – rozsah souboru

Hodnota korelačního koeficientu byla velice nízká, proto byly ze souboru vyloučeny všechny třetí moláry, jednalo se o vzorky č. 3, 4, 5, 6a a 7, z důvodu největších odchylek mezi odhadovaným a skutečným věkem. Odchytky byly v porovnání s ostatními kategoriemi zubů výrazně vyšší a ve dvou případech dokonce překračovaly 100%. Příčinou takto výrazné neshody mezi odhadovaným a skutečným věkem jedince je pravděpodobně vysoká variabilita ve věku erupce třetích molárů.



Graf 2 – Korelace odhadovaného a skutečného věku jedinců souboru  $n = 35$

Byla proto provedena nová korelace pro soubor bez vyloučených třetích molárů, ( $n = 30$ ), jejíž výsledky ukazuje následující tabulka 10. V tomto případě bylo dosaženo vysoké statistické významnosti, což prokázala p-hodnota testu  $0,000011 < 0,01$ . Míra závislosti sledovaných veličin je znázorněna v grafu 3. Dosažená hodnota korelačního koeficientu  $r = 0,709$  byla mnohem vyšší než v předchozím případě a byla tak potvrzena poměrně vysoká závislost odhadovaného a skutečného chronologického věku jedince.

	$\bar{x}$	s	r	$r^2$	p	sv	n
odhadovaný věk	49,593	10,909					
skutečný věk	51,433	14,219	0,709	0,503	0,000011 < 0,01	**	30

Tab. 10 – Statistické vyhodnocení souboru  $n = 30$

$\bar{x}$  - průměrná hodnota znaku

s – směrodatná odchylka znaku

r – korelační koeficient

$r^2$  – koeficient determinace

sv – statistická významnost

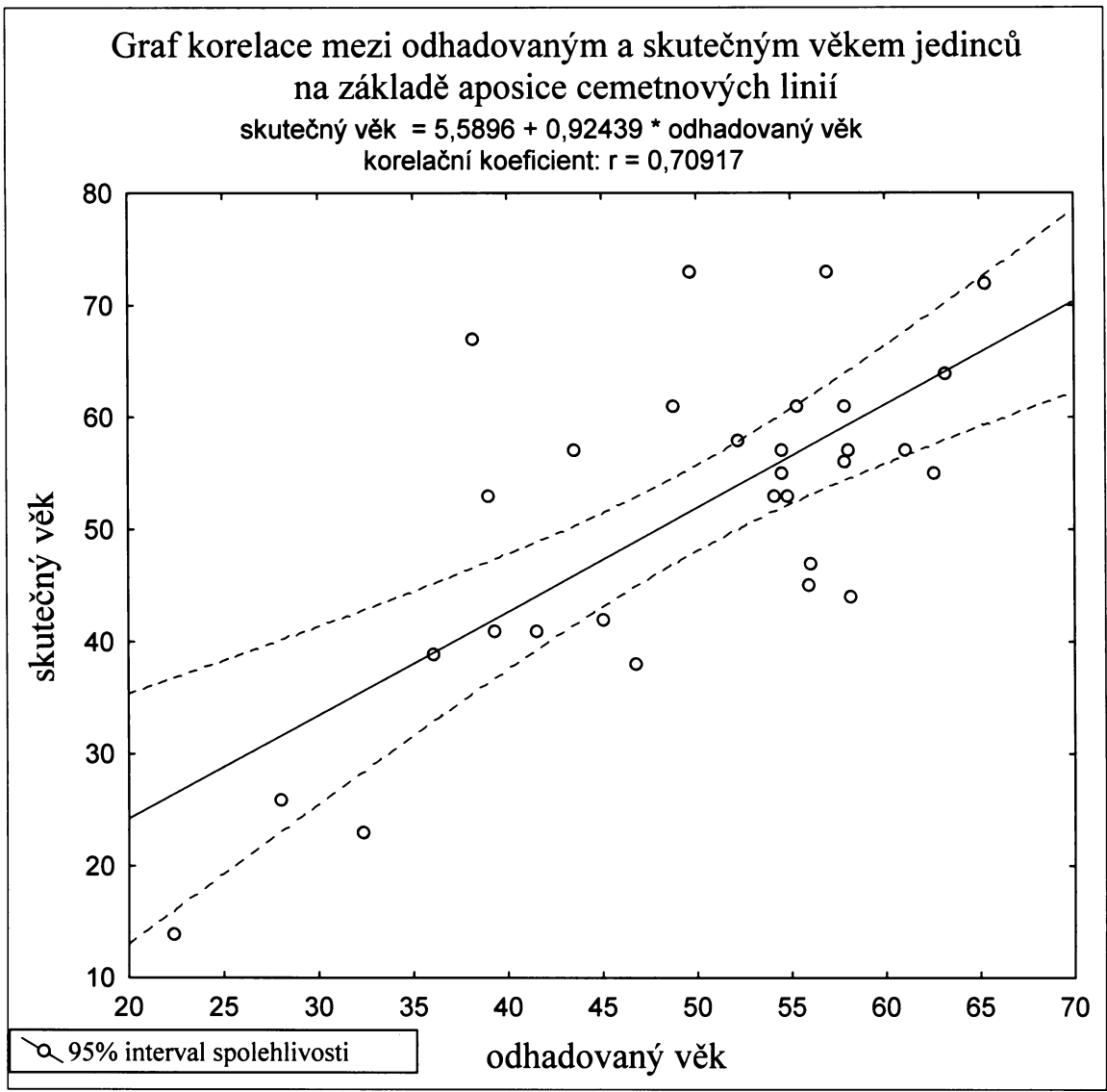
- statisticky nevýznamné

\* statisticky významné na 5% hladině významnosti  $\alpha$

\*\* statisticky významné na 1% hladině významnosti  $\alpha$  (vysoká statistická významnost)

p – dosažená hladina významnosti

n – rozsah souboru



Graf 3 – Korelace odhadovaného a skutečného věku jedinců souboru  $n = 30$

## 4.2. URČENÍ CHYBY ODEČTU APOSIČNÍCH CEMENTOVÝCH LINIÍ

Pro vyjádření spolehlivosti odečtu cementových aposičních linií bylo použito koeficientu reliability R, neboli míry spolehlivosti měření.

Byla zjišťována intraindividuální chyba odečtu aposičních linií cementu a vyjádřena koeficientem reliability  $R = 0,95$ . Tato dosažená hodnota  $R > 0,9$ , to znamená, že 95% celkové variance zjištěného počtu aposičních cementových linií na kořeni zubu je způsobeno skutečnou biologickou variabilitou a pouze 5% je způsobeno chybou měření. Dále byla zjišťována interindividuální chyba odečtu cementových aposic a opět vyjádřena koeficientem reliability  $R = 0,94$ . V tomto případě je 94% celkové variance způsobeno skutečnou biologickou variabilitou a 6% představuje chybu při odečítání cementových aposic.

Následující tabulka 11 ukazuje podíly biologické variability a chyby měření na celkové variabilitě odečtu cementových aposičních linií v případě intraindividuální a interindividuální reliability.

	R	biologická variabilita v %	chyba počítání cement. aposic v %
intraindividuální reliabilita	0,95	95	5
interindividuální reliabilita	0,94	94	6

Tab. 11 – Podíl biologické variability a chyby měření na zjištěné reliabilitě

R – reliabilita (spolehlivost měření)

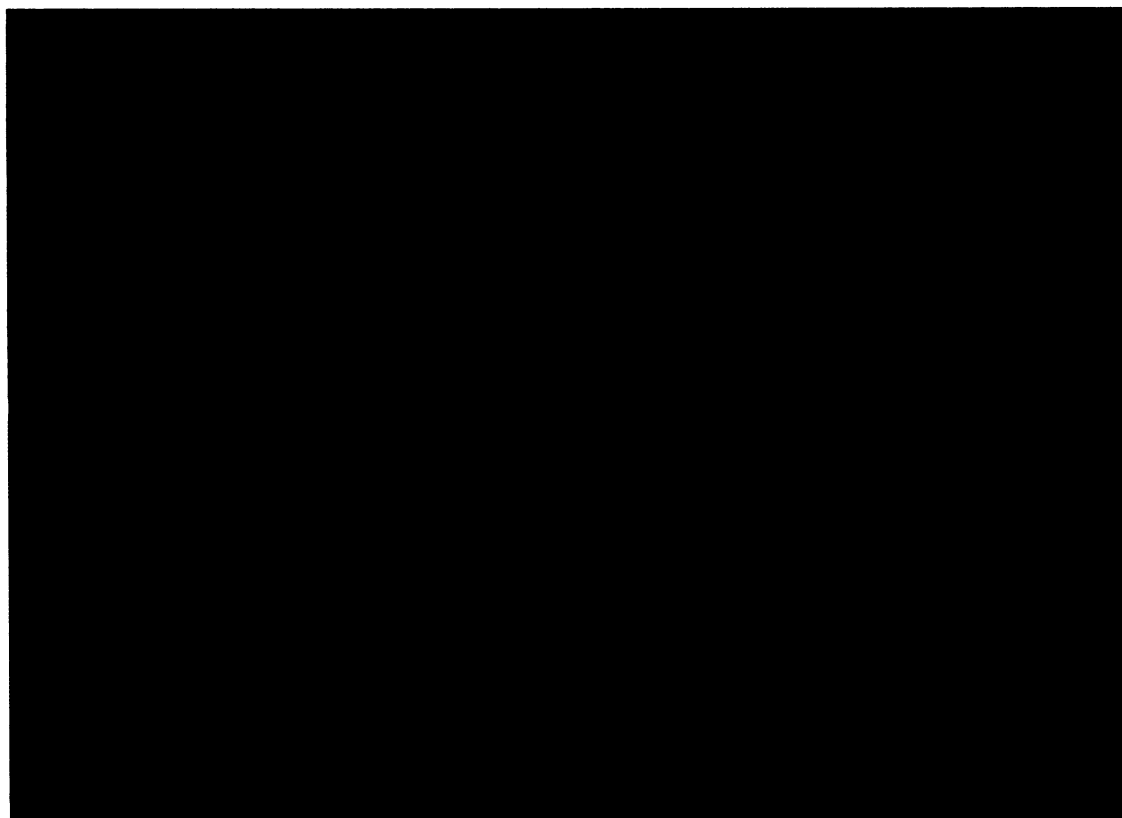
### 4.3. SROVNÁNÍ METODICKÝCH PŘÍSTUPŮ ZHOTOVOVÁNÍ HISTOLOGICKÝCH PREPARÁTŮ

V předkládané diplomové práci byly otestovány oba alternativní postupy zhotovování histologických preparátů z tvrdých zubních tkání, tedy zhotovení nedekalcifikovaných zubních výbrusů a zalévání dekalifikované zubní tkáně do Paraplastu X-TRA<sup>®</sup>.

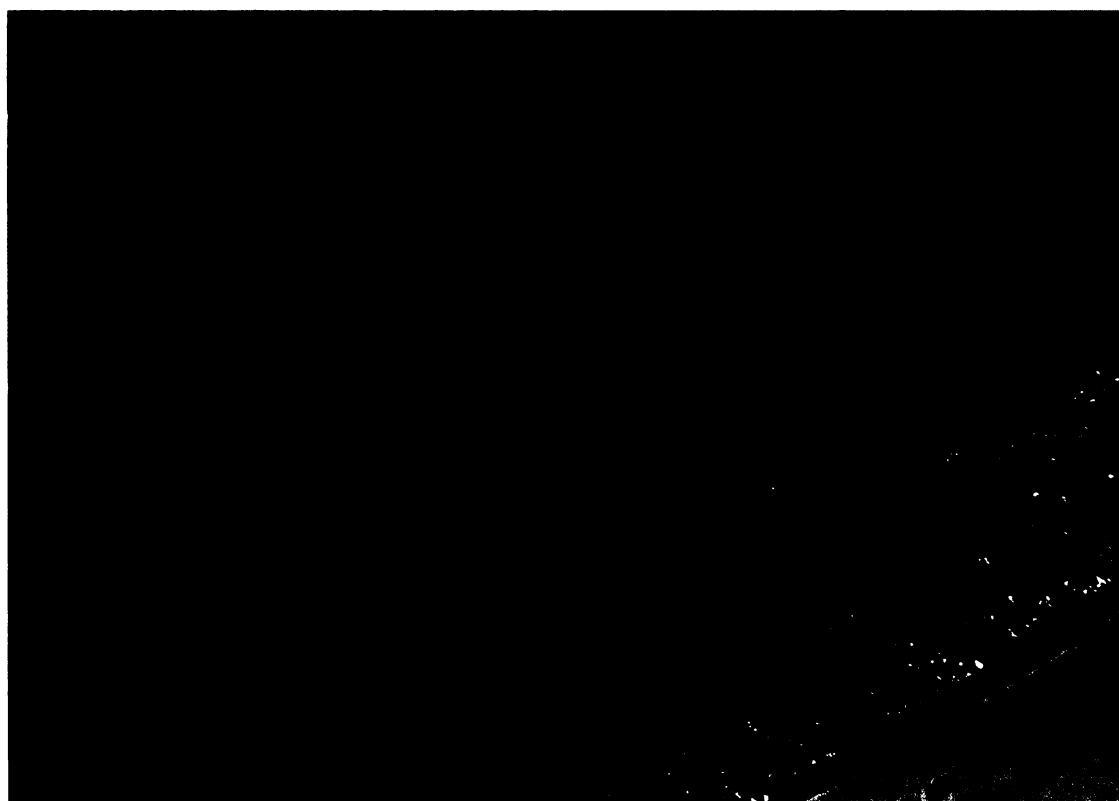
Bylo prokázáno, že oba metodické přístupy jsou vhodné a pro zhotovení histologických preparátů, nezbytných ke kvalitnímu odečítání cementových aposičních linií, dobře použitelné. Z důvodů zjednodušení laboratorního postupu při přípravě histologických zubních preparátů a vzhledem k vhodnému technickému zázemí laboratoře, která disponuje vlastním mikrotomem a termostatem, byla pro diplomovou práci zvolena metoda dekalifikace zubní tkáně a její následné zalévání do Paraplastu X-TRA<sup>®</sup>. Přestože je zvolená metoda poměrně časově náročná, výsledné preparáty jsou kvalitní a cementové linie jsou dobře čitelné. Navíc se předchází riziku znehodnocení preparátu, které hrozí při zhotovování zubního výbrusu. Ve finálních fázích broušení může dojít k vypadnutí tenké ploténky zubu ze zalévacího média a následnému poškození cementové vrstvy na povrchu kořene či přímo ke zlomení zhotovovaného výbrusu.

Důležitou roli při odečítání cementových aposičních linií hraje nejen kvalita histologického preparátu a jeho vhodné zvětšení při pozorování v mikroskopu, ale především použití kvalitní optiky mikroskopu.

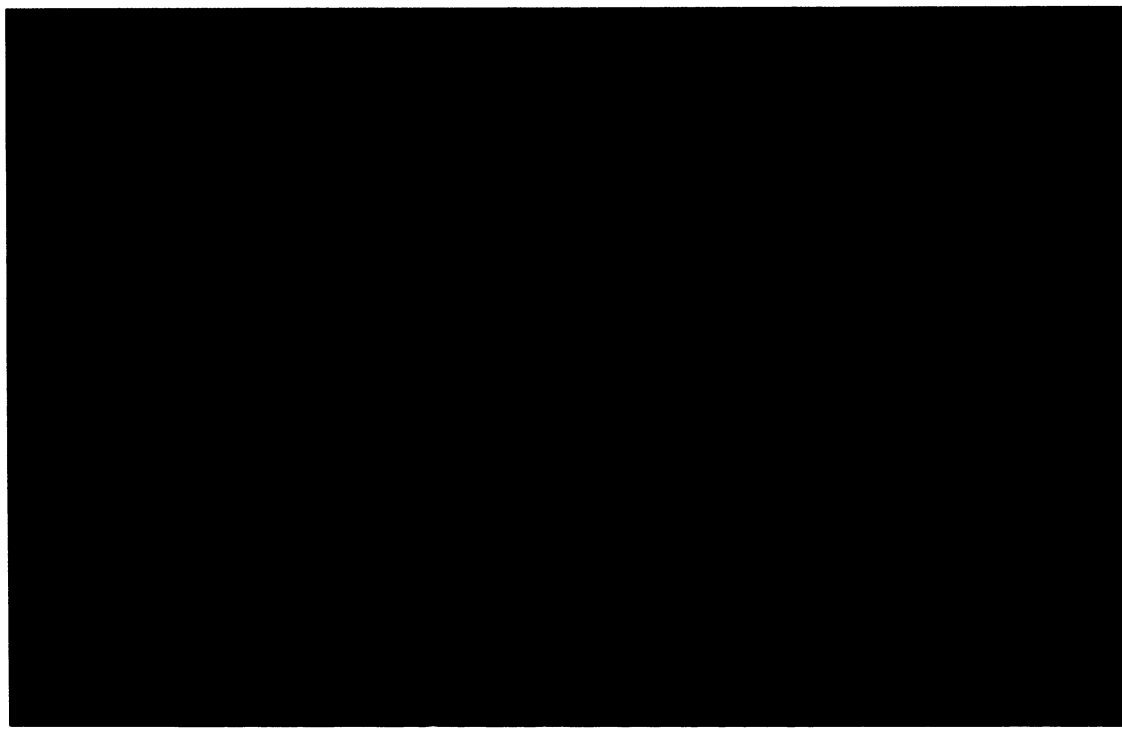
Fotografie několika preparátů, které byly pro diplomovou práci zhotoveny, ukazují následující obrázky.



Obr. 13 – Výbrus zubního kořene, barveno eosinem, zvětšení 160x



Obr. 14 – Výbrus zubního kořene, barveno hematoxylinem, zvětšení 160x



Obr. 15 – Histologický řez dekalifikovaného zubního kořene, barveno Alizarinem S, zvětšení 160x, vzorek č. 3



Obr. 16 – Histologický řez dekalifikovaného zubního kořene, barveno Alizarinem S, zvětšení 160x, vzorek č. 35



## 5. DISKUSE

V předkládané diplomové práci byla sledována aposice cementové vrstvy na povrchu kořene zubu a především její vztah, tedy míra korelace, ke skutečnému chronologickému věku jedince. Tato metoda byla množstvím odborníků shledána jako vhodná a spolehlivá pro odhad biologického věku dospělých jedinců a dále doporučována pro praktické použití při identifikaci jedinců v různých medicínských či antropologických oborech (např.: Stott 1982, Naylor 1985, Charles 1986, Kagerer 2001, Bojarun 2003, Bojarun 2004, Wittwer-Backofen 2004, Czermak 2006 a další).

Tato metoda byla původně používána k odhadu věku pouze u volně žijících zvířat (Mansfield 1960 in Naylor 1985, Free 1966 in Naylor 1985), protože právě u savců se sezónními změnami v příjmu potravy byly poprvé pozorovány změny ve struktuře cementové vrstvy, které se vizuálně projevovaly jako střídající se tmavé a světlé linie. Cementové aposice byly sledovány téměř u všech savčích druhů (např.: Marks 1966, Klevezal 1967, Wada 1978 a další). Až později byla metoda aplikována také na člověka (Stott 1982). Viditelné rozlišení tmavých a světlých pravidelně se střídajících pruhů cementu je pravděpodobně způsobeno změnami v mikrostruktuře cementu, související s rozdíly v orientaci kolagenních vláken jednotlivých přírůstkových linií (Lieberman 1993, Bosshardt 1997). Existují však také názory, že za viditelné vrstvení cementu je zodpovědná velikost a orientace krystalů anorganických solí obsažených v cementu (Cool 2002).

Nedílnou součástí diplomové práce, bylo nalezení nejvhodnějšího metodického postupu zpracování tvrdých zubních tkání a zhotovení histologických preparátů použitelných pro sledování a počítání cementových aposic. Jako rutinní postup pro přípravu histologických preparátů z hodnoceného souboru vzorků, byla na základě odborných článků (Condon 1986, Bojarun 2004), zvolena metoda dekalciфикации tvrdé zubní tkáně a její následné zalití do Paraplastu X-TRA<sup>®</sup>, krájení na mikrotomu, s použitím speciálních mikrotomových žiletek, na tenké příčné řezy o síle přibližně 10-15  $\mu\text{m}$  a barvení 1 % roztokem Alizarinové červeně S. Jedním z hlavních argumentů pro preferenci zmíněné metodiky bylo kromě odborné literatury také technická vybavenost laboratoře a menší manuální náročnost této metody. Dále je zvolený postup dekalciфикации, v porovnání s metodou zhotovování zubních výbrusů, méně riskantní z hlediska poškození preparátu. Během postupu zhotovení výbrusu může nastat situace,

kdy se broušený segment zubu uvolní a vypadne ze zalévacího média, a stává se tak velmi křehký a náchylný k poškození. Povrchová vrstva cementu může být za těchto podmínek snadno poškozena a použití takového preparátu k počítání cementových aposic by mohlo být nespolehlivé a zavádějící.

Řada autorů (Stott 1982, Naylor 1985, Bojarun 2004, Wittwer-Backofen 2004, Maat 2006), volila pro přípravu histologických zubních preparátů metodiku, která stojí na pomezí mezi oběma možnými přístupy. Jedná se o postup, kdy nedekalcifikovaná zubní tkáň byla přímo, v některých případech i bez zalití do zalévacího média na bázi metylmetakrylové pryskyřice, krájena pomocí rotačního mikrotomu s použitím diamantového nože vhodného pro krájení mineralizované tvrdé tkáně.

V poslední době se stále víc autorů snaží o automatizaci hodnocení cementových přírůstkových vrstev, prostřednictvím počítačových programů a digitalizace celého procesu analýzy histologických preparátů cementové vrstvy zubu (Bojarun 2004, Czermak 2006).

Pozorování histologických preparátů v mikroskopu s použitím vhodné optiky, je důležitější záležitostí, než je na první pohled zřejmé. Pozorování preparátů, připravených pro diplomovou práci, bylo prováděno na třech mikroskopech s různou kvalitou optiky, nejčastěji při 160násobném zvětšení. Byl zkoušen mikroskop Micro XSP-102A s méně kvalitní optikou a cementová vrstva kořene se jevila jako celistvá bez výraznějšího náznaku aposičních linií. Dále byl testován mikroskop Leica BME, vybavený achromatickými objektivy redukujícími chromatickou vadu, ale bez schopnosti redukovat sférickou vadu čočky, ve kterém nebyly linie příliš dobře odlišitelné. Třetím typem použitého mikroskopu byl Jenalumar SH250, vybavený velmi kvalitní optikou s planachromatickým objektivem redukujícím sférickou vadu čočky, s jehož použitím byly cementové linie na preparátech nejlépe odlišitelné a počítatelné. Všechny snímky histologických vzorků pro diplomovou práci, byly proto pořízeny na posledním jmenovaném mikroskopu Jenalumar SH250. Fotografie vzorků jsou kvalitní a i při velké zvětšení jsou aposiční linie cementu dobře patrné a spolehlivost jejich odečítání se tím zvyšuje. Pořízené fotografie byly vyhodnocovány manuálně v počítačovém programu Microsoft Photo Editor.

Recentní soubor, na kterém byla metoda odhadu biologického věku jedince na základě počtu cementových aposic studována, původně obsahoval 39 vzorků extrahovaných lidských zubů trvalé dentice, pocházejících od 35 jedinců, v poměru 15 žen a 20 mužů, ve věkovém rozpětí od 14 do 73 let. Do studie bylo zahrnuto 8

mesiálních řezáků, 5 laterálních řezáků, 10 špičáků, 5 prvních premolárů, 6 druhých premolárů a 5 třetích molárů. Byly vybírány pouze zuby jednokořenné nebo zuby vícekořenné se splývajícími konvergentními kořeny. Hodnocený soubor nebyl rozdělen podle pohlaví ani podle kategorií zubů, a to na základě odborných studií (např.: Sousa 1999, Kagerer 2001, Bojarun 2003, Wittwer-Backofen 2004), které ukazují, že neexistuje žádný statisticky významný vliv pohlaví a typu zubu na kvalitu odhadu věku pomocí metody odečtu cementových aposic.

Z původního souboru 39 vzorků musely být během vyhodnocování pořízených fotografií vyloučeny 4 vzorky, protože jejich cementové aposiční linie byly velmi nečitelné a zjišťování jejich počtu bylo prakticky nemožné.

Při statistickém zpracování sledovaného souboru byla zjišťována míra korelace mezi odhadovaným věkem, který byl získán součtem průměrného počtu aposičních cementových linií a průměrným věkem erupce daného zubu, a skutečným chronologickým věkem jedince. Dosažená hodnota korelačního koeficientu  $r = 0,418$  byla velmi nízká, ale statisticky významná, a proto bylo z hodnoceného souboru vyloučeno 5 vzorků třetích molárů, protože vykazovaly největší chyby v odhadovaném věku. Odchyly mezi odhadovaným a skutečným věkem jedince u třetích molárů překračovaly 50% (53,1% a 72,2%) a ve dvou případech dokonce přesáhly 100% (145,6% a 158,8%), pouze v jednom případě byla procentuální odchylka přijatelná (9%). Ve čtyřech případech použití třetích molárů, byl odhadovaný věk vůči skutečnému věku výrazně nadhodnocován a v jednom případě došlo k podhodnocení skutečného věku jedince. Výsledný soubor se po vyloučení třetích molárů zmenšil na konečných 30 vzorků. Zjištěná hodnota korelačního koeficientu, po vyřazení všech třetích molárů ze souboru, dosahovala, v porovnání s předešlým výsledkem, podstatně vyšší hodnoty  $r = 0,709$ . Byla tak prokázána závislost mezi biologickým věkem, odhadovaným na základě počtu cementových aposic na kořeni zubu, a skutečným chronologickým věkem jedince. Dosažená  $p$  hodnota testu byla nižší než  $\alpha = 0,01$  a prokázala tak vysokou statistickou významnost zjištěných výsledků na 1% hladině významnosti. Dále bylo na rozdíl od jiných studií (Kagerer 2001, Wittwer-Backofen 2004) zjištěno, že třetí moláry nejsou pro odhadování biologického věku vhodné a jejich zařazení do vyšetřovaného souboru může vést ke zkresleným výsledkům a neobjektivním závěrům.

U dvou jedinců v hodnoceném souboru byly sledovány dva vzorky pocházející ze dvou různých typů zubů, a bylo tak možné porovnat míru dosažené shody mezi vzorky

získanými o shodného jedince. V prvním případě (vzorek č. 11) byly srovnávány preparáty zhotovené ze špičáku a druhého premoláru, a u obou vzorků dosahovala procentuální odchylka mezi odhadovaným a skutečným věkem nízkých hodnot, špičák 1,8% a druhý premolár 4,4%. Také v druhém případě (vzorek č. 24) bylo dosaženo příznivých hodnot procentuálních odchylek mezi odhadovaným a skutečným věkem, u špičáku 1,2% a u mesiálního řezáku 4,1%. I přes to, že srovnání bylo možné provést pouze na dvou jedincích, a bylo tak pouze orientační, lze říci, že v hodnoceném souboru nehraje typ zubu velkou roli při odhadu biologického věku jedince pomocí počtu cementových aposic, a u vzorků pocházejících od shodného jedince je dosahováno podobných hodnot procentuálních odchylek mezi odhadovaným a skutečným věkem jedince.

V rámci statistického hodnocení sledovaného souboru byla zjišťována také míra intraindividuální a interindividuální chyby odečtu cementových aposic a byla vyjádřena koeficientem reliability (R). V případě intraindividuální chyby  $R = 0,95$  a interindividuální chyby  $R = 0,94$ . Intraindividuální chyba měření se na celkové varianci zjištěného počtu cementových aposic podílela 5% a interindividuální chyba měření 6%. Dosažená hodnota spolehlivosti měření byla uspokojivá, i přesto, že v porovnání s jinými pracemi byly zjištěné hodnoty chyb měření větší, např. Charles 1986 dosáhl 5% interindividuální chyby a 2% intraindividuální chyby. Možným vysvětlením je větší praxe v odečítání cementových přírůstkových linií.

Předkládaná diplomová práce, se shoduje se závěry mnoha odborných studií o silné závislosti mezi počtem cementových aposic na povrchu zubního kořene a skutečným věkem, a o vhodnosti použití této metody k odhadu biologického věku jedince.

## 6. ZÁVĚR

V předkládané diplomové práci byl zpracováván recentní soubor 39 extrahovaných lidských zubů permanentní dentice, pocházejících od 35 jedinců různého věku od 14 do 73 let.

V diplomové práci byla vypracována vhodná metodika přípravy histologických preparátů z tvrdé zubní tkáně, a to jak mineralizované tak demineralizované. Byla navržena metoda zhotovení výbrusů z nedekalcifikované zubní tkáně a rovněž metoda šetrné dekalifikace zubní tkáně a její následné zalití do zalévacího média a krájení na mikrotomu na tenké řezy, přičemž oba histologické postupy jsou dobře použitelné pro metodu odhadu biologického věku pomocí aposice cementu.

Dále bylo zjištěno, že nejvhodnější metodou pro sledování počtu cementových aposic je zhotovení fotografií v mikroskopu, při přibližně 160násobném zvětšení, a jejich následné zpracovávání v počítačovém programu Microsoft Photo Editor. Pro kvalitu pořízených fotografií a také pro samotné pozorování preparátů v mikroskopu jsou důležité nejen metodika přípravy histologických preparátů a vhodné zvětšení při fotografování, ale především kvalitní optika mikroskopu, která je schopna redukovat sférickou vadu čočky pomocí planachromatického objektivu. Bez mikroskopu s kvalitní optikou není možné dosáhnout dobrých podmínek pro pořizování fotografií a s tím související dosažení spolehlivých výsledků.

Při zjišťování míry závislosti mezi biologickým věkem jedince, odhadovaným na základě počtu cementových aposic na povrchu kořene zubu, a skutečným chronologickým věkem jedince, byla prostřednictvím dosažené p-hodnoty testu na 1% hladině významnosti, zjištěna statisticky významná závislost mezi sledovanými veličinami. Míra této závislosti byla vyjádřena koeficientem korelace  $r = 0,709$ .

Byly tak splněny všechny tři cíle formulované v úvodu této diplomové práce.

## **7. SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ**

ACETON, p.a. – p-lab, katalogové číslo A01101

ALIZARINOVÁ ČERVENĚ S – p-lab, R 03481

DENTACRYL TECHNICKÝ – SpofaDental, 1311188-1

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

EOSIN Y – Sigma-Aldrich, E4009

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

ETHYLALKOHOL, bezvodý, p.a., min. 99,8 % - p-lab, E 03502

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

HEMATOXYLIN, pro mikroskopii – Fluka, 51260

PARAPLAST X-TRA – p-lab, R 788271

XYLEN, p.a. – p-lab, X 01101

## 8. SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1 - Stádia abraze zubů horní čelisti s uvedením příslušných věkových intervalů (převzato a upraveno z Lovejoy 1985b) – str. 10
- Obr. 2 - Stádia abraze zubů dolní čelisti s uvedením příslušných věkových intervalů (převzato a upraveno z Lovejoy 1985b) – str. 10
- Obr. 3 - Involuční změny sledované na výbrusech frontálních zubů podle Kiliána (Kilián 1981) – str. 12
- Obr. 4 - Bodové hodnocení morfologických změn sagitálního řezu zubem podle Kiliána (Kilián 1981) – str. 13
- Obr. 5 - Nákres sagitálního řezu vyvíjejícími se čelistmi (Moore 2002) – str. 20
- Obr. 6 - Schematické nákresy vývoje řezáku – sagitální řez (Moore 2002) – str. 23
- Obr. 7 - Sagitální řez řezákem (Mazurová 2004) – str. 28
- Obr. 8 - Mikrofotografie zubní pulpy (Junqueira 1999) – str. 29
- Obr. 9 - Hranice dentinu a pulpy (Mazurová 2004) – str. 30
- Obr. 10 - Mikrofotografie řezu vyvíjejícím se zubem (Junqueira 1999) – str. 31
- Obr. 11 - Typy periodonálních vazů (Mazurová 2004) – str. 37
- Obr. 12 - Obrázek přestavby alveolární kosti (Mazurová 2004) – str. 38
- Obr. 13 – Výbrus zubního kořene, barveno eosinem, zvětšení 160x – str. 63
- Obr. 14 – Výbrus zubního kořene, barveno hematoxylinem, zvětšení 160x – str. 63
- Obr. 15 – Histologický řez dekalifikovaného zubního kořene, barveno Alizarinem S, zvětšení 160x, vzorek č. 3 – str. 64
- Obr. 16 – Histologický řez dekalifikovaného zubního kořene, barveno Alizarinem S, zvětšení 160x, vzorek č. 35 – str. 64

## **9. SEZNAM TABULEK A GRAFŮ**

Tab. 1 – Věk prořezání zubů dočasné dentice (Perlíková 2006) – str. 25

Tab. 2 – Věk prořezání zubů trvalé dentice (Perlíková 2006) – str. 26

Tab. 3 – Sestupná etanolová řada (Vacek 1988) – str. 46

Tab. 4 – Vzestupná etanolová řada (Vacek 1988) – str. 48

Tab. 5 – Sestupná etanolová řada (Vacek 1988) – str. 49

Tab. 6 – Složení hodnoceného souboru – str. 52

Tab. 7 – Soubor jedinců hodnocených v diplomové práci – str. 54

Tab. 8 – Výsledky dosažené počítáním cementových aposičních linií – str. 56

Tab. 9 – Statistické vyhodnocení souboru  $n = 35$  – str. 57

Tab. 10 – Statistické vyhodnocení souboru  $n = 30$  – str. 59

Tab. 11 – Podíl biologické variability a chyby měření na zjištěné reliabilitě – str. 61

Graf 1 – Složení hodnoceného souboru podle pohlaví – str. 53

Graf 2 – Korelace odhadovaného a skutečného věku jedinců souboru  $n = 35$  – str. 58

Graf 3 – Korelace odhadovaného a skutečného věku jedinců souboru  $n = 30$  – str. 60



## 10. POUŽITÁ LITERATURA

- Bojarun R., Garmus A., Jankauskas R.(2003): Microstructure of dental cementum and individual biological age estimation. *Medicina* 39(10): 960-964.
- Bojarun R., Jankauskas R., Garmus A.(2004): Age estimation using incremental lines in dental cementum. *Rechtsmedizin* 14: 405-408.
- Bosshardt D.D., Selvig K.A.(1997): Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontology* 2000 13: 41-75.
- Condon K., Charles K.D., Cheverud J.M., Buikstra J.E.(1986): Cementum annulations and age determination in *Homo sapiens*. II. Estimate and accuracy. *Am. J. Phys. Anthropol.* 71: 321-330.
- Cool S.M., Forwood M.R., Campbell P., Bennett M.B.(2002): Comparison between bone and cementum compositions and the possible basis for their layered appearances. *Bone* 30(2): 386-392.
- Czermak A., Ernst H., Grupe G.(2006): A new method for the automated age-at-death evaluation by tooth-cementum annulation (TCA). *Anthropologischer Anzeiger* 64(1): 25-40.
- Čihák R.(2002): *Anatomie 2*, Grada Publishing, Praha,
- Großkopf B.(1989): Incremental lines in prehistoric cremated teeth. A technical note. *Z. Morphol. Anthropol.* 77: 309-311.
- Großkopf B., Denden J.M., Krüger W.(1996): Untersuchungen zur Zementapposition bei *Paradontitis marginalis profunda*. *Dtsch. Zahn Z.* 51: 295-297.
- Gustafson G.(1950): Age determination of teeth. *J Am Dent Assoc* 41: 45-54.
- Herianová T.(2004): *Určení pohlaví na základě trvalé dentice dětských koster z Mikulčic*. Diplomová práce, UK PŘF, Praha
- Hillson S.(1996): *Dental anthropology*. University Press, Cambridge.
- Charles K.D., Condon K., Cheverud J.M., Buikstra J.E.(1986): Cementum annulations and age determination in *Homo sapiens* I. Tooth variability and observer error. *Am. J. Phys. Anthropol.* 71: 311-320.
- Jankauskas R., Barakauskas S., Bojarun R.(2001): Incremental lines of dental cementum in biological age estimation. *Homo* 52: 59-71.
- Junqueira J.C., Carneiro J., Kelley R.O.(1997): *Základy histologie*. 7. vyd. Nakladatelství a vydavatelství H & H, Jinočany

- Kagerer P., Grupe G.(2001): Age-at-death diagnosis and determination of life-history parameters by incremental lines in human dental cementum as an identification aid. *Forensic Sci. Int.* 118: 75-82
- Kilián J., Šídlo R., Merglová V.(1981): K problematice určování stáří jedince podle chrupu. *Soudní lékařství* 26,3: 33-42, (část II), 26,4: 49-59.
- Klevezal G.A., Kleinenberg S.E.(1967): Age Determination of Mammals from Annual Layers in Teeth and Bones (translated from Russian by J. Salkind, 1969). U.S. Department of Commerce, Springfield, 128 pp.
- Klika E., Vacek Z.(1985): *Histologie*, Avicenum
- Komínek J., Rozkocová E.(1984): Metoda určování zubního věku, In: Urban F.: *Pokroky ve stomatologii* 2, 175- 191, Avicenum, Praha
- Lieberman D.E.(1993): Life history variables preserved in dental cementum microstructure. *Science* 261: 1162-1164.
- Lieberman D.E.(1994): The biological basis of seasonal increments in dental cementum and their applications to archaeological research. *J.Archaeol. Sci.* 21: 525-539.
- Lipsinic F.E., Paunovich E., Houston G.D., Robinson S.F.(1986): Correlation of Age and Incremental Lines in the Cementum of Human Teeth. *J.For.Sci.* 31,3: 982-989.
- Lovejoy O.C.(1985b): Dental Wear in the Libben Population: Its Functional Pattern and Role in the Determination of Adult Skeletal Age at Death, *Am. J. Phys. Anthropol.* 68: 47-56.
- Lucas P.W., Loh H.S.(1986): Are incremental lines in human cementum layed down annually? *Ann. Acad. Med.* 15: 384-386.
- Maat G.J.R., Gerretsen R.R.R., Aarents M.J.(2006): Improving the visibility of tooth cementum annulations by adjustment of the cutting angle of microscopic sections. *Forensic Sci. Int.* 159: S95-S99.
- Marks S.A., Erickson A.W.(1966): Age Determination in the Black Bear. *J Wildl Mngmt* 30: 389-410.
- Mazurová Y.(2004): *Obecná stavba zubu, materiály k přednášce.* [www.lfhk.cuni.cz/histologie](http://www.lfhk.cuni.cz/histologie)
- Miller C.S., Dove S.B., Cottone J.A.(1988): Failure of use of cemental annulations in teeth to determine the age of humans. *J. For. Sci.* 33: 137-143.
- Moore K.L., Persaud T.V.N.(2002): *Zrození člověka. Embryologie s klinickým zaměřením.* ISV nakladatelství, Praha

- Naylor J.W., Miller W.G., Stokes G.N., Stott G.G.(1985): Cemental Annulation Enhancement: A Technique for Age Determination in Man. *Am. J. Phys. Anthropol.* 68: 197-200.
- Perlíková Š.(2006): Stav chrupu současné české populace. Diplomová práce, UK PFF, Praha
- Pilin A.(1982): Možnosti určení věku podle zubů. *Soudní lékařství* 27,2: 1-10.
- Pilin A., Šturmankin J.(1987): K odhadu věku neznámých mrtvol a kosterních nálezů podle výbrusu zubů. *Čs. kriminalistika* 20,3: 225-233.
- Renz H., Radlanski R.J.(2006): Incremental lines in root cementum of human teeth – a reliable age marker? *Homo* 57(1):29-50.
- Sedláčková J.(2005): Variabilita lebečních rozměrů lišky obecné (*Vulpes vulpes*) v České republice. Diplomová práce, UK PFF, Praha
- Schultz M.(2001): Paleohistopatology of Bone: A New Approach to the Study of Ancient Diseases. *Yearbook Phys. Anthropol.* 44:106-147.
- Sousa E.M., Stott G.G., Alves J.B.(1999): Determination of age from cemental incremental lines for forensic dentistry. *Biotech- Histochem.* 74(4): 185-193.
- Stevens A., Lowe J.(2005): *Human histology*, third edition, Elsevier Mosby
- Stloukal M., Dobisíková M., Kuželka V., Stránská P., Velemínský P., Vyhnálek L., Zvára K.(1999): *Antropologie Příručka pro studium kostry*. Národní muzeum, Praha
- Stott G.G., Sis R.F., Levy B.M.(1982): Cemental Annulation as an Age Criterion in Forensic Dentistry. *J. Dent. Res.* 61: 814-817.
- Šmahel Z.(2001): *Principy, teorie a metody auxologie*, Karolinum, Praha,
- Ubelaker H.D.(1978): *Human Skeletal Remains. Excavation, analysis, interpretation.* Aldine Publishing Company, Chicago.
- Ubelaker H.D.(1978): Estimating Age at Death from Immature Human Skeleton: An Overview. *J.For.Sci.* 32, 5: 1254-1263.
- Vilímovská D.(1993): Pokus o určení pohlaví na podkladě dentice dětských koster z Rajhradu. Diplomová práce, UK PFF, Praha
- Vlček E., Mrklas L.(1975): Modification of the Gustafson Method of Determination of Age according to Teeth on Prehistorical and Historical Osteological Material. *Scripta Medica Brno* 48, 3-4: 203-208.
- von Hagens G.(1979): Impregnation of soft biological specimens with thermostetting resins and elastomers. *Anat. Rec.* 194: 247-255.

Wada K., Ohtaishi N., Hachiya N.(1978): Determination of Age in the Japanese Money from Growth Layers in the Dental Cementum. *Primates* 19: 775-784.

Wittwer-Backofen U., Gampe J., Vaupel J.W.(2004): Tooth Cementum Annulation for Age Estimation: Results From a Large Known-Age Validation Study. *Am. J. Phys. Anthropol.* 123: 119-129.

Wolf J.(1940): *Mikroskopická technika*. SZdN, Praha

Zvárová J.(1998): *Základy statistiky pro biomedicínské obory*, Karolinum, Praha