

# DENTİN TABAKASINDA OSTEOKALSİN DÜZEYİ VE MİKROSERTLİK ÖLÇÜMÜ\*

Fatma Koray<sup>1</sup> Yegâne Güven<sup>2</sup> Saadet Özgümüş<sup>3</sup> Sevde Duç<sup>4</sup>

Yayın kuruluna teslim tarihi : 27.3.1995

Yayına kabul tarihi : 26.9.1995

## Özet

Bu çalışmada 20-35 yaşlarındaki kişilerden ortodontik ve protetik nedenlerle çekilen 20 çürüksüz, 10 çürüğü bulunan toplam 30 adet küçük ve büyük azı dişin dentin tabakasında osteokalsin düzeyleri radioimmunoassaya ile saptanmıştır. Çürük dişlerde osteokalsin düzeyleri, çürüksüz dişlere göre azaldı ( $p<0.05$ ). Kadın ve erkekler arasında fark bulunmadı. Çürük ve çürüksüz dişlerde mikrosertlik ölçümleri arasında bir fark bulunmadı.

Anahtar sözcükler : Dentin, osteokalsin, mikrosertlik

## GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

Osteokalsin kemikte osteoblastlar tarafından sentez edilen kollajen dışı bir proteindir (23). Bu proteinin sağlıklı kişilerde kemik yapımının spesifik bir indeksi olduğu (27) ve metabolik kemik hastalıklarında değiştiği bildirilmiştir (5,10,20,24). Bu nedenle, bu proteinin serum düzeyleri kemik metabolizmasının göstergesi olarak kullanılmaktadır (4,6).

Dişin dentin tabakası gerek embriyolojik kökeni, gerekse yapısal komponentleri açısından kemik dokusuna benzerlik göstermektedir (19). Dentin tübülüslerinin içinde odontoblastların protoplazmik uzantıları bulunmaktadır (21). Protoplazmik uzantı ile tübülüs duvarı arasında bulunan fibrillerin kollajen yapılı olduğu bildirilmiştir (15). İntertübüler dentinde organik matriksin temel elemanı kollajen lifleridir. Dentin kollajeninin çoğunlukla tip I olduğu, bunu tip III'ün izlediği bildirilmektedir (19). Kollajenden başka fos-

## OSTEOCALCIN LEVELS AND MICROHARDNESS OF HUMAN DENTINAL TISSUE

### Abstract

In this research, osteocalcin levels of dentin were measured by a radioimmunoassay in 20 teeth without caries extracted for orthodontic and prosthetic reasons from 20-35 years old patients and 10 teeth with caries, totally 30 molars and premolars.

Osteocalcin levels in the teeth with caries slightly decreased compared with the teeth without caries ( $p<0.05$ ). There were no differences between females and males. No significant differences were detected in the measurement of microhardness between the teeth with and without caries.

Key words: Dentin, osteocalcin, microhardness

foproteinler,  $\gamma$  - karboksi glutamat içeren proteinler, proteoglikanlar, asidik glikoproteinler ve serum proteinleri bulunmaktadır.  $\gamma$  -karboksi glutamat kapsayan proteinlerden osteokalsinin dentin mineralizasyonunda etkili olduğu (18,19,28), yapısında bulunan karboksil grupları aracılığı ile kalsiyum iyonlarını bağladığı bildirilmiştir (28).

Osteokalsinin sekretuar odontoblastlarda da bulunduğu (2,7,8,11,12,13,19) ve mineralizasyon öncesi odontoblastlar tarafından sentez edildiği (3,8,11,13) gösterilmiştir. Sentez edilen osteokalsin, intrasellüler veziküller içinde bulunmaktadır. İnterasellüler veziküller içinde pre-dentini aşırı doğrudan pre-dentin ve dentin arasındaki mineralizasyon bölgesine yollandığı bildirilmiştir. Odontoblastların protoplazmik uzantılarındaki madde alışverişinin olduğu bölgelerde rezorptif fonksiyon belirtilerine de rastlanmaktadır (1,12,19). Siçan dişi germelerinde ve kemiğinde yapılan bir çalışmada osteokalsinin, mineralize denti-

\* Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

1 Prof Dr İÜ Diş Hek Fak Konservatif Diş Tedavisi Bilim Dalı

2 Doç Dr İÜ Diş Hek Fak Biokimya Birimi

3 Doç Dr İÜ Mühendislik Fak Kimya Müh. Bölümü

4 Doktora Öğrencisi, İÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü

nin oluşumundan önce odontoblastlarda bulunduğu gösterilmiştir (2). Mark ve ark. (22) ve Bronckers ve ark. (2) kemik oluşumunun erken devrelerinde, indirekt immünfloresans tekniği ile odontoblastlarda osteokalsinin varlığını tespit etmişlerdir.

Fizyolojik olarak diş köklerinin apikal bölgelerinde rastlanan ve optik özelliğinden ismini alan transparan dentin, kuron bölgesinde aşınma, kuron fraktürü, çürük gibi patolojik olayların sonucunda dentin dokusunun açığa çıkması nedeniyle de oluşur. Dentin çürüğünde, özellikle yavaş ilerleyen çürük olayında çürük tabanında saptanan transparan tabakada dentin yıkımına rastlanmamaktadır (25). Burada dentin kanallarına çeşitli kalsiyum fosfat kristallerinin çökeldiği, bu çökeltmenin bazen lümeni daraltacak, hatta kapatabilecek kadar aşırı üretildiği bildirilmiştir (16).

En yaygın hastalıklardan biri olan diş çürüklerinde çürük dentinin transparan tabakası, çürüğün prognozu açısından büyük önem taşımaktadır. Bu tabakada dentin kanallarının lümeni yeni oluşan kalsiyum tuzları ile daralmış ve hatta bazen tamamen kapanmış olduğundan pulpayı irrite edecek ajanların ulaşım yolları da ortadan kalkmaktadır. Bu çalışmada, kemik metabolizmasında önemli rolü olduğu bilinen osteokalsinin normal dentin ve transparan dentindeki kantitatif ölçümlerini yapmak ve transparan dentinin oluşumu ile osteokalsin miktarı arasında bu bağlantıyı araştırmak hedeflenmiştir.

Ayrıca dentin ve transparan dentinin mikrosertlik ölçümleri de yapılarak, bu bulgular da araştırma kapsamında irdelenmek istenmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, ortodontik ve protetik nedenlerle çekilen ve 20-35 yaş grubundan 10 kadın, 10 erkeğe ait 20 diş (kontrol grubu) ile aynı yaş grubundan beş kadın, beş erkeğe ait 10 çürüklü dişte (deney grubu) osteokalsin tayini yapıldı.

Dişler yıkanıp temizlendikten sonra hava ile kurutulup, soğukta kalıplama yöntemi (cold moulding) uygulanarak kalıba alındı (9). Malzeme olarak katılaştığında tamamen saydam olan polyster kullanıldı. Bu kalıplanan dişlerde kesit alınması gereken noktalar işaretlendi. Isomet (11-1180 Low Speed) aleti ile etil alkol spreyi altında kesit alındı. Simetrik olarak alınan kesitle

ikiye ayrılan dişin dentin tabakasının bir kısmında osteokalsin tayini yapılırken (30), diğer kısmında mikrosertlik ölçümü yapıldı. Bunun için Leitz (small-hardness) cihazı kullanıldı. Birimi "Vickerse", olarak ifade edilen sertlik  $\text{kg/mm}^2$  olarak hesaplandı. Bunun için tayin edilecek kısım kaptan çıkarıldı. Çürük bulunan dişlerde transparan dentin bölgesi, sağlıklı dişlerde ise benzer bölgedeki normal dentin dokusu frezle çıkartıldı. Toz hale getirildi. 10 mg tartıldı. Ekstrat elde edebilmek için 2 ml A tamponu\*/g diş tozu olacak şekilde tampon çözeltiyle karıştırıldı. Aynı tampona karşı 7 gün dializ edildi. Dializ işlemi, özel olarak hazırlanan iki ucu açık tüplerin bir tarafını yarı geçirgen bir zarla kapatmak suretiyle  $+4^\circ\text{C}$ 'de yapıldı. Daha sonra B tamponuna\*\* karşı 3 gün dializ edilerek EDTA uzaklaştırıldı. Çözünmeyen kısım 4000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırıldı. Geri kalan supernatantta RIA kit (Immuno Nuclear Corp. Stillwater, MN, USA) ile osteokalsin tayin edildi (26). Standartlar çift örnek çalışıldı. Gruplar arası anlamlılığı ölçmek için Student-t testi kullanıldı.

## BULGULAR

Sağlıklı ve çürüklü dişlerde osteokalsin düzeyleri sırasıyla, ortalama  $31.11 \pm 6.41$ ,  $25.37 \pm 5.96$  ng/g olarak bulundu (Tablo : 1). Buna göre aralarında  $p < 0.05$  düzeyinde anlamlı bir fark saptandı. Diğer taraftan kadın ve erkeklerde gerek sağlıklı, gerekse çürüklü dişlerde osteokalsin miktarında anlamlı bir fark bulunmadı. Mikrosertlik ölçümleri ise sağlıklı dişlerde ortalama  $57.27 \pm 7.23$  Vickerse, çürüklü dişlerde ise  $53.87 \pm 10.79$  Vickerse olarak saptandı (Tablo 2). Sağlıklı ve çürüklü dişlerde olduğu gibi, kadın-erkek dişlerinin mikrosertlikleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

Tablo : 1 Sağlıklı ve çürük dişin transparan dentin tabakasında osteokalsin düzeyleri (ng/g)

Cinsiyet	Sağlıklı Dentin n = 20	Transparan Dentin n = 10
Kadın	$31.00 \pm 6.63$	$25.30 \pm 4.44$
Erkek	$31.20 \pm 7.01$	$25.44 \pm 7.60$
Toplam	$31.11 \pm 6.41$	$25.37 \pm 5.96^*$

\*Sağlıklı dentine göre:  $p < 0.05$

\* A Tamponu: 1 M EDTA, 50 mM Tris HCl (pH 8), 0.1 M NaCl, 30 mM benzamidin, % 0.2 tripsin inhibitör, 10.000 U trasilol.

\*\* B Tamponu: 1 M NaCl, 50 mM Tris HCl (pH 7.4).

**Tablo : 2. Sağlıklı ve transparan dentinde sertlik ölçümler Birimi: Vickerse (kg/mm<sup>2</sup>) p: 500 g**

Cinsiyet	Sağlıklı Dentin n = 20	Transparan Dentin n = 10
Kadın	53.32 ± 3.08	53.33 ± 11.78
Erkek	61.22 ± 8.43	54.49 ± 10.33
Toplam	57.27 ± 7.23	53.87 ± 10.79

Sağlıklı ve çürük dentinde anlamlı bir fark bulunmadı.

## TARTIŞMA

Çalışmamızda grupların yaşı benzer tutularak, dentin yapısında yaşa bağlı olarak ortaya çıkan değişikliklerin sonucu etkilemesi azaltılmıştır. İncelenen dentin parçalarının benzer derinliklerden alınmasıyla da, mine dentin sınırından dentin-pulpa sınırına kadar izlenen yapısal değişikliklerin etkisi en aza indirilmiştir. Mikrosertlik ölçümlerinin, osteokalsin tayin edilen dentinin simetrik bölgesinde yapılmasıyla da birbiriyle özdeş sayılabilecek doku bölümlerinde çalışma imkânı sağlanmıştır.

Sıçanların keser ve molar dişlerinde yapılan tayinlerde, osteokalsin, gerek odontoblastlarda (2,7,8,11,13,19), gerekse mineralizasyonun başlamasıyla predentinde (12) ve dentinde (11,18) saptanırken, siğir dentininde saptanamamıştır (28). Gorter de Vries ve ark. (12), insan dişlerinde yaptıkları bir çalışmada, osteokalsin immunoreaksiyonunu mine-dentin sınırında saptamışlardır. Araştırmacılar dentinde az miktarda bulunan osteokalsinin ameloblastlarda depolandığını bildirmişlerdir. Bu çalışma da dahil olmak üzere, dentinde osteokalsin tayini ile ilgili çalışmaların çoğu histokimyasal yöntemlerle yapılmıştır (1,2,3,11,13). Diş sert dokularından osteokalsin ekstraksiyonu yapılan bir çalışmada 30 milyon yıllık bir fosilin dişlerinde 0.8 mg/g diş osteokalsin bulunmuştur (30). Bizim çalışmamızda, insan dentin dokusunda 25 ng/g diş bulunmuş olup, bunun çok altında bir değerdir. Bu sonuç yukarıda sözü edilen araştırmalarla ve insan dişlerinde osteokalsin tespit edilen çalışmalarla (26,27) uygunluk göstermektedir. Bu çalışmada, bireylerin yaşının genç olması dolayısıyla sekonder dentin üretiminin ve mineralizasyonunun olması ve dentin örneklerinin sirkumpulper dentinin orta tabaklarından alınmış olmasının etkisi düşünülmelidir.

Transparan dentinde osteokalsin değerleri sağlıklı dentine göre düşük bulunmuştur. Trans-

paran dentinde dentin kanallarının, peritübüler dentin duvarından başlayarak büyük hacimli kristallerin oluşumuyla tıkanmış mikromorfolojik olarak gösterilmiştir (15). Bu olayların gerçekleştiği bölge predentinde mineralizasyonun başladığı sınırdan daha periferdedir. Bu bulgu transparan dentin bölgesinde odontoblastın protoplazmik uzantısının zarar görmüş olabileceğini ve fonksiyonel aktivitesinin olmadığını düşündürmektedir. Ayrıca periferde tübüler dentin oluşumuna ilişkin aktivite hücrenin sekresyon kapasitesi açısından yavaştır. Tübüler dentin üretiminde ve buradaki mineral çekirdeklerinin oluşmasında buraya normal dokunun üretiminde olduğu gibi hücreden veziküller içinde osteokalsin üretilmesi yetersiz kalmaktadır (17).

Bronckers ve ark. (2) sıçanların keser molar diş germlerinde odontoblastın protoplazmik uzantısında osteokalsinin az oranda saptandığını, bunun da osteokalsinin hızlı transportu ya da sınırlı transportu nedeniyle olabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda dentin kanallarının yeni oluşan mineraller ile tıkanmış bölgelerde osteokalsin miktarında azalma saptanması, yukarıdaki araştırmada ileri sürülen savı destekler mahiyettedir.

Gorter ve ark. (12) sıçanlarda odontoblastların granüler tipte endoplazmik retikulum sistemlerinde, golgi aygıtında ve az sayıdaki transport vezikülünde osteokalsin bildirmişlerdir. Bu çalışma, odontoblastın protoplazmik uzantısında periferde yeni mineral kristalleri oluşumu ile dentin tübülüslerinin daralıp tıkanmışları transparan bölgede osteokalsinin az oranda bulunduğunu düşündürmektedir. Transparan dentinde intratübüler kalsiyum fosfat kristalleri büyük boyutlu kristallerdir. Ayrıca intratübüler mineralizasyonda amorf kalsiyum fosfatlar da görülmektedir (16). Romberg ve ark. (29) yaptıkları in vitro araştırmalarda gla-proteinlerinin hidroksiapatit kristallerinin büyümesini inhibe ettiğini ve amorf kalsiyum fosfatlara bağlanmadığını bildirmişlerdir. Çalışmada transparan dentinde osteokalsin miktarının az oranda saptanması, bu literatür verileriyle uyumludur. Ancak tüm bu çalışmalar, sıçanlarda deneysel ya da in vitro çalışmalardır. İnsan dişlerindeki bulgularla bunların tartışılmasında türe özgü farkların göz ardı edilmemesi gerekmektedir. Mineralizasyonun, nükleasyon safhasında, mineral nükleatörü olarak dentinde ve olasılıkla dentin tübülüsünün duvarında osteokalsinden daha ön planda olan fosfoproteinler ve

proteoglikanlar da vardır (19). Transparan dentinde dentin tübülüsü içinde mineral nükleasyonu, burada bulunan ya da odontoplastlar tarafından salgılanan non-kollajen fosfoproteinler, proteoglikanlar ve osteokalsinin etkili olduğu düşünülmeli ve bunun yanısıra ortamdaki pH değişikliklerinin ve kalsiyum, fosfat iyon konsantrasyonunun bu mineral çökmesinde rolü olduğu unutulmamalıdır.

*Bu çalışmada dişlerin kalıplanıp, kesit alma ve sertlik ölçümü aşamalarında bizlere yardımcı olan Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu-Malzeme Bölümü yönetici ve çalışanlarına teşekkür ederiz.*

## KAYNAKLAR

1. Bronckers AL, Gay S, Dimuzio MT, Butler WT. Immunolocalization of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid-containing proteins in developing molar tooth germs of the rat. *Coll Rel Res* 1985; 5: 17-22.
2. Bronckers AL, Gay S, Finkelman RD, Butler Wt. Immunolocalization of gla-proteins (osteocalcin) in rat tooth germs: Comparison between indirect immunofluorescence peroxidase antiperoxidase, avidin-biotinperoxidase complex and avidin-biotin-gold complex with silver enhancement. *J Histochem Cytochem* 1987; 35: 825-30.
3. Bronckers AL, Gay S, Finkelman RD, Butler WT. Developmental appearance of gla-proteins (osteocalcin) and alkaline phosphatase in tooth germs and bones of the rat. *Bone Mineral* 1987; 2: 361-73.
4. Brown JP, Delmas PD, Malaval L, Eduard C, Chapuy MC, Meunier PJ. Serum bone gla-protein a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 1984; I: 1091-3.
5. Brown JP, Delmas PD, Arlot M, Meunier JP. Active bone turnover of the cortico-endosteal envelope in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol and Met* 1987; 64: 954-9.
6. Deftos LJ, Parthermore JG, Price PA. Changes in plasma bone gla-protein during treatment of bone disease. *Calcif Tissue Int* 1982; 34: 121-4.
7. Di Muzio MT, Bhowan M, Butler WT. The biosynthesis of dentin  $\gamma$ -carboxyglutamic acid containing proteins by rat incisor odontoblasts in organculture. *Biochem J* 1983; 216: 249-57.
8. Finkelman RD, Butler WT. Appearance of dentin  $\gamma$ -carboxygluamic acid containing proteins in developing rat molars in vitro. *J Dent Res* 1985; 64: 1008-15.
9. Geçkinli E. Metalografi. İstanbul, İst. Teknik Üniv. Matbaası 1989: 8-10.
10. Gevers G, Dequeker J. Collagen and noncollagenous protein content in the iliac crest bone and serum osteocalcin in women with and without hand osteoarthritis. *Coll Rel Res* 1987; 7: 435-42.
11. Gorter de Vries J, Quartier E, Boute P, Wisse E, Coomans D. Immunocytochemical localization of osteocalcin in developing rat teeth. *J Dent Res* 1987; 66: 784-90.
12. Gorter de Vries J, Coomans D, Wisse E. Ultrastructural localization of osteocalcin in rat tooth germs by immunogold staining. *Histochem* 1988; 89: 509-14.
13. Gorter de Vries J, Coomans D, Wisse E. Immunocytochemical localization of osteocalcin in human and bovine teeth. *Calcif Tissue Int* 1988; 43: 128-30.
14. Herkströter FM, Witjes M, Ruben J, Arends J. Time dependency of microhardness indentations in human and bovine dentin compared with human enamel. *Caries Res* 1989; 23: 342-4.
15. Johansen E, Parks HF. Electron microscope observations on sound human dentine. *Arch Oral Biol* 1962; 7: 185-93.
16. Johansen E: Ultrastructural and chemical observations on dental caries. In: Sognaes R ed. Mechanism of hard tissue destruction. Washington DC: Am Ass Adv Sci 1963: 187-211.
17. Jones SJ, Boyde A. Ultrastructure of dentin and dentinogenesis. In: Linde A ed. Dentin and dentinogenesis. CRC Press, Boca Raton, 1984: 81-134.
18. Linde A. Differences between non-collagenous protein content of rat incisor and permanent bovine dentin. *Scand J Dent Res* 1988; 96: 188-98.
19. Linde A. Dentin matrix proteins: Composition and possible function in calcification. *Anat Rec* 1989; 224: 154-66.
20. Ljunghall S, Hallgren R, Rastad J. Serum osteocalcin levels in normal subjects and patients with primary hyperparathyroidism. *Expt Clin Endocrinol* 1985; 86: 218-22.

21. Manisalı Y, Koray F. Ağız-Diş embriyolojisi ve histolojisi. İstanbul. Yenilik Basımevi, 1982: 99-105.

22. Mark MP, Butler WT, Finkelman RD, Ruch JV. Bone  $\gamma$ -carboxyglutamic acid containing protein (osteocalcin) expression by osteoblasts during mandibular bone development in fetal rats: absence of correlation with the mineralization process. *Med Sci Res* 1987; **15**: 1299-1300.

23. Nishimoto SK, Price PA. Proof that the  $\gamma$ -carboxyglutamic acid containing bone protein is synthesized in calf bone. *J Biol Chem* 1979; **254**: 437-41.

24. Oberlin F, Guillemant J, Guillemant S, Loison S, Turpin G. L'osteocalcine: un index d'evolutivite de l'acromegalie? *La Presse Medicale* 1988; **17**: 166.

25. Pilz W: Jahnkaries Grundlagen der Kariologie und Endodontie. In: Pilz W, Plathner CH, Tatz H eds. München: Carl Hauser, 1980: 240-7.

26. Price P, Nishimoto S. Radioimmunoassay for the vita-

min K-dependent protein of bone and its discovery in plasma. *Proc Natl Acad Sci* 1980; **77**: 2234-8.

27. Price PA, Parthemore JG, Deftos LJ. New biochemical marker for bone metabolism: measurement by radioimmunoassay of bone gla-protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. *J Clin Invest* 1980; **66**: 878-83.

28. Price PA, Williamson MK. Primary structure of bovine matrix gla-protein a new vitamin K-dependent bone protein. *J Biol Chem* 1985; **260**: 14971-5.

29. Romberg RW, Werness PG, Riggs BL, Mann KG. Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. *Biochemistry* 1986; **24**: 1176-80.

30. Ulrich MMV, Perizonius WRK, Spoor CF, Sandberg P, Vermeer C. Extraction of osteocalcin from fossil bones and teeth. *Biochem Biophys Res Comm* 1987; **149**: 712-9.

*Yazışma adresi:*

*Prof Dr Fatma Koray  
İ Ü Diş Hek Fak  
Konservatif Diş Tedavisi  
Bilim Dalı  
34390 Çapa - İstanbul*