

## Permeabele Structuren in normaal glazuur\*)

door Dr. M. T. Jansen, arts en Dr. J. B. Visser, tandarts

### Inleiding

Het vraagstuk van de permeabiliteit van het glazuur is door een groot aantal onderzoekers met behulp van alle ten dienste staande methoden bestudeerd. Als gevolg van deze onderzoekingen staat ons een zeer heterogeen materiaal ter beschikking. Wanneer men dit materiaal analyseert, blijkt, dat de resultaten van de onderzoekers niet alleen uit een oogpunt van methodiek en object verschillen, doch zelfs ook wat betreft de doelstelling van het onderzoek. Men kan zich niet aan de indruk onttrekken, dat vele auteurs hun onderzoek verrichtten zonder zich voldoende rekenschap te geven van de plaats, die hun resultaten in het geheel van het glazuuronderzoek zouden innemen.

Met het oog hierop hebben wij allereerst getracht, door ordening van de gegevens uit de literatuur ons een beeld te vormen van de verschillende aspecten, die het permeabiliteitsprobleem biedt. Dit is geschied van de volgende gezichtspunten uit:

### 1°. Doelstellingen

A. Men kan zich bezighouden met het permeabiliteitsprobleem, uitsluitend in verband met mogelijke physiologische processen in de glazuurkap als geheel.

B. Men kan trachten na te gaan, welke microscopisch-anatomische onderdelen eventueel permeabel zijn en welke niet.

In het eerste geval zal het onderzoek een meer *physiologisch* en in het tweede geval een meer *morphologisch* karakter dragen. In overeenstemming daarmede zullen zowel de methoden als de resultaten moeten verschillen. Zolang nu de synthese tussen physiologie en morfologie van het glazuur nog in zo geringe mate verwezenlijkt

\*) De inhoud dezer mededeling werd gepubliceerd in de Journal of Dental Research Vol. 29. No. 5 October 1950.

Voordrachten over dit onderwerp werden gehouden op de Najaarsvergadering der Vereeniging van Nederl. Tandartsen, 12 Nov. 1949.

is, zal het nodig zijn het onderscheid tussen deze aspecten voor ogen te houden, opdat wij niet voorbarig uit morphologische gegevens tot het bestaan van physiologische processen besluiten. Dit is bijvoorbeeld het geval, wanneer men uit overigens correcte kleuringsproeven tracht te bewijzen of te weerleggen dat het glazuur „vitaal” is.

### 2°. *Methoden*

De tot nu toe gebruikte methoden kunnen in de volgende groepen worden ondergebracht:

- A. Permeabiliteitsproeven met chemisch te identificeren stoffen.
- B. Permeabiliteitsproeven met fysisch te identificeren stoffen
  - I. door middel van radio-actieve isotopen
  - II. door middel van kleurstoffen.

Voor het onderzoek naar de permeabiliteit van de glazuurkap als geheel (zie IA) kan men zich van elk van deze methoden bedienen, voor het morphologische onderzoek heeft zich tot nu toe alleen de methode B II practisch bruikbaar getoond.

### 3°. *Objecten*

Hierbij dienen wij allereerst onderscheid te maken tussen:

- A. Proeven in vitro.
- B. Proeven in vivo.

Verder kan het van belang zijn of men zijn proeven verricht op dieren dan wel op mensen, en welke elementen men daarbij uitkiest (dentitie, soort, ouderdom, vitaliteit van de pulpa).

Tenslotte moet men, vooral bij het beoordelen van de resultaten van experimenten in vivo, rekening houden met eventuele veranderingen of beschadigingen (b.v. door boren, slijpen of overkappen) die men terwille van het experiment aan het element of zijn omgeving heeft teweeggebracht \*).

Op grond van uitgebreide literatuurstudie kwamen wij tot de overtuiging, dat bij de huidige stand van de kennis van het permeabiliteitsprobleem in de eerste plaats de volgende punten voor een nader onderzoek in aanmerking zouden komen:

---

\*) Teneinde een onoverzichtelijke opsomming van de onderzoekingen der door ons geraadpleegde auteurs te vermijden, hebben wij ons ertoe bepaald, in de literatuurlijst de inhoud der artikelen — waar toepasselijk — aan te duiden aan de hand van de hierboven gebruikte indeling in cijfers in letters. (bijv.: een morphologisch onderzoek, uitgevoerd met kleurstoffen in vivo, wordt aangeduid met 1B—2BII—3B).

1°. Komt in de normale mond in het intacte glazuur een verplaatsing van stoffen tot stand en zo ja, welke zijn deze stoffen, in welke richting worden zij verplaatst en wat is de drijvende kracht bij deze verplaatsing?

2°. Zijn in de normale mond in het intacte glazuur permeabele structuren microscopisch aantoonbaar?

De onder 1° genoemde vragen zijn duidelijk „fysiologisch”, terwijl vraag 2 van zuiver morfologisch karakter schijnt te zijn. Dit laatste is echter niet geheel het geval, want met nadruk wordt de voorwaarde gesteld, dat het glazuur onbeschadigd moet zijn en zich in de normale mond moet bevinden. Hieruit blijkt, dat het aan twijfel onderhevig is dat het glazuur van een geëxtraheerd element zich op dezelfde wijze gedraagt als „normaal” glazuur. Derhalve is het behoud van de fysiologische omstandigheden bij elk experiment, dat erop gericht is, vraag 2 te beantwoorden, even noodzakelijk als bij zuiver fysiologische experimenten en daardoor krijgt vraag 2, hoewel hoofdzakelijk morfologisch, toch ook een fysiologisch aspect.

Nu mag men aannemen, dat nagenoeg alle onderzoekers zich bij hun proeven door bovengenoemde, althans soortgelijke, doelstellingen lieten leiden. Het treft echter bij de literatuurstudie, dat weliswaar hun conclusies veelal het antwoord op bovenvermelde vragen bevatten, doch dat bij de methodiek dikwijls geen rekening is gehouden met de eisen, die deze vragen in zich bergen. Zo is het bijvoorbeeld verwonderlijk, hoe lichtvaardig sommige auteurs op grond van proeven *in vitro* zijn gekomen tot conclusies betreffende hetgeen zich afspeelt in de normale mond (o.a. Atkinson<sup>2</sup>, Bouysson<sup>13</sup>, van Hartingsvelt<sup>21</sup>, Herzig<sup>22</sup> en Smreker<sup>35</sup>).

Anderen hebben terecht de noodzaak van experimenten *in vivo* ingezien, doch ook dan is niet altijd voldoende rekening gehouden met het behoud van de fysiologische omstandigheden der onderzochte elementen: zo mag men bijvoorbeeld niet a priori vooronderstellen, dat het glazuur van aangeboorde elementen zich op gelijke wijze zal gedragen als dat van intacte elementen.

Het is ons tijdens het onderzoek duidelijk geworden, dat het onmogelijk is, beide bovengenoemde vragen tegelijkertijd, d.w.z. binnen het kader van één experiment, te beantwoorden. Immers, elk der beide vragen vereist een passende methode van onderzoek, die niet ter zelfder tijd kan worden dienstbaar gemaakt aan de be-

antwoording van de andere vraag. Wij moesten ons naar onze mening dus tot één aspect van het probleem beperken en kozen het onder 2° genoemde.

De vooronderstelde permeabele structuren in het glazuur kunnen slechts na kleuring als zodanig herkend worden. Kleurstoffen, die voor dit doel bruikbaar zijn, worden in de normale mond niet aangetroffen. Wij waren dus gedwongen, de microscopische banen van het glazuur te onderzoeken na applicatie van aan het lichaam vreemde kleurstoffen. Maar deze omstandigheid sloot meteen elke poging, met behulp van kleurstoffen de *physiologische* vraag te beantwoorden (vraag 1 dus), uit. Hiertoe zouden radio-actieve isotopen zich bijzonder goed lenen, doch deze zijn weer van minder waarde voor het morphologische onderzoek, aangezien men ze voorshands nog niet zo nauwkeurig kan localiseren als kleurstoffen (Bodecker<sup>11</sup>).

Op grond van bovenstaande overwegingen waren wij in staat een beperkt doch uitvoerbaar plan van onderzoek te formuleren, n.l.: dringt een kleurstof normaal glazuur binnen en welke structuren worden daarbij gekleurd? Dit onderzoek zou dus slechts antwoord kunnen geven op vraag 2. Voorzover wij weten hebben alleen W a n n e n m a c h e r<sup>44</sup>, L e f k o w i t z e n B o d e c k e r<sup>27</sup> en K a n n e r<sup>25</sup> getracht, glazuur onder normale of nagenoeg normale omstandigheden van buiten af te kleuren. Daar hun resultaten niet overeenstemmen, meenden wij, dat een herhaling van hun experimenten met een geschiktere techniek gewettigd was.

#### *Eigen onderzoek*

Men kan trachten, de kleurstof het normale glazuur te doen binnendringen:

- a. van het buitenoppervlak af (applicatie op het glazuuroppervlak).
- b. van de pulpa uit (b.v. door injectie in de bloedbaan).

Met het oog op het mogelijke belang van dit onderzoek voor een juist inzicht in hetgeen zich afspeelt, wanneer de elementen door fluoorhoudende stoffen (b.v. uit tandpasta's) worden omgeven, kozen wij de onder a genoemde applicatiemethode en pasten deze toe op honden. Onze proefdieren waren merendeels zeer jong, zodat wij de melkelementen in het onderzoek konden betrekken. In de literatuur wordt op grond van overigens afwijkende proeven aangegeven, dat het glazuur hiervan gemakkelijk doordringbaar is (F i s h<sup>16</sup>, B o d e c k e r<sup>10, 11</sup> en V o l k e r<sup>43</sup>).

## *Techniek van het onderzoek*

De applicatie der kleurstoffen geschiedde op twee manieren:

1°. *Door middel van contactvullingen.* Deze methode werd het eerst toegepast en wel op oudere honden \*). In enkele blijvende incisivi werden — onder morphine-anaesthesie — ruime caviteiten geboord; hierin werd een onderlaag van de kleurstof in poedervorm aangebracht waarna de caviteiten met oxyphosphaat- of silicaat-cement werden afgesloten. De vullingen werden met tandvernis overtrokken. Gezorgd werd, dat over een aanzienlijk oppervlak slechts een spleetvormige ruimte bestond tussen de vulling en het later te onderzoeken aangrenzende gave element. Het spreekt, gezien de voorwaarden die wij ons hadden gesteld, vanzelf, dat deze buurtand tijdens de behandeling niet door de boor geraakt mocht worden! Al eerder was gebleken, dat de kleurstof in voldoende mate door en langs de cementvulling diffundeerde, om een voortdurende aanvoer naar het speeksel, dat de buurtand omspoelde, te verzekeren. De honden leefden na deze behandeling nog 1—4 dagen. (Zie overigens voor een ingenieuze methode op dit gebied Bodecker en Lefkowitz 9).

2. *Door middel van directe applicatie.* Toen wij uit de eerstgenoemde methode de indruk kregen, dat ook kortere applicatietijd kleuring zou teweeg brengen, beproefden wij het volgende: Op de melkcanini van jonge hondjes, genarcotiseerd door middel van pentothal-Na, werden watten gebracht, doordrenkt met een kleurstofoplossing van bekende concentratie. Deze watten werden tijdens het experiment op hun plaats gehouden door ruim uitgeboorde kurkjes, zodat van een hermetische afsluiting geen sprake was. Deze methode had het voordeel, dat niet alleen de kleurstof-concentratie nu bekend was, doch ook, dat de applicatietijden voor de verschillende canini bij één dier nauwkeurig konden worden vastgesteld. Deze tijden varieerden van 2—30 minuten. Steeds werd één der canini als contrôle-element vóór het begin van het experiment geëxtraheerd en verder op volkomen gelijke wijze behandeld als de gekleurde elementen (zie onder).

### *Kleurstoffen*

De gebruikte kleurstof moest in de eerste plaats niet toxisch of adstringerend werken, daar anders de physiologische omstandig-

\*) Over deze dieren hadden wij de beschikking dank zij de medewerking van de Directeur van het Physiologisch Laboratorium te Utrecht.

heden alleen al door de applicatie ervan in gevaar zouden worden gebracht. Het gebruik van stoffen als b.v. zilvernitraat kon dan ook niet overwogen worden.

Bij oriënterende proeven werd aanvankelijk methyleen-blauw gebruikt, doch het bleek dat nauwkeurige localisatie van deze stof in dunne coupes en bij geringe concentratie onmogelijk was. Bij het microscopiseren bij gewoon licht is n.l. het contrast tussen de blauwe kleur van de kleurstof en de donkere diffractielijnen der prismascheden te gering om conclusies toe te laten (zie ook U r b a n t s c h i t s c h <sup>39</sup> en G u s t a f s o n <sup>19</sup>). Dit bezwaar ondervingen wij, door op voorstel van de Directeur van dit Instituut, Prof. Dr. H. B e r k e l b a c h v a n d e r S p r e n k e l fluorescerende kleurstoffen en gefilterd ultraviolet licht te gebruiken (zie ook W a n n e n m a c h e r <sup>44</sup>), waarbij wij een kleurstof moesten kiezen, die in een andere tint fluoresceert dan het glazuur zelf. Een voordeel van sommige fluorescerende kleurstoffen is bovendien, dat zij in ultraviolet licht bij veel sterkere verdunning nog zichtbaar zijn dan talrijke gewone kleurstoffen in wit licht. Het bleek, dat vooral *trypaflavine* bij sterke verdunning nog een goed zichtbare geelgroene fluorescentie vertoonde, die duidelijk afstak tegen de blauwige eigen fluorescentie van glazuur. Op grond hiervan viel onze keuze op deze kleurstof. Wanneer dus in de loop van dit betoog gesproken wordt van permeabele structuren, dan wordt bedoeld, dat *trypaflavine* in deze structuren aantoonbaar was.

### *Microscopische Techniek*

Na beëindiging van de kleurstof-applicatie volgde extractie der elementen. Ons doel was, van dit moment af *iedere* verdere verplaatsing van ingedrongen kleurstof te voorkomen. Hiertoe dienden de volgende maatregelen:

1°. Vries-droog-methode van A l t m a n n - G e r s h. In het kort komt deze hierop neer, dat het te onderzoeken weefsel zo snel mogelijk diep wordt bevroren, n.l. in vloeibare lucht ( $-195^{\circ}$  C.). Hierdoor wordt iedere diffusie verhinderd. Door de zeer snelle temperatuursdaling bevriest het in het object aanwezige water in zó kleine kristallen, dat hierdoor geen microscopisch zichtbare deformatie te vrezes is. Daarna wordt het weefsel snel in een ruimte overgebracht waarin de temperatuur van vloeibare ammoniak heerst ( $-33^{\circ}$  C.) en die communiceert met een andere ruimte, welke  $P_2O_5$  bevat. In deze ruimten wordt een vacuum onderhouden. Onder deze om-

standigheden sublimeert het ijs tot waterdamp, die direct door het sterk hygroscopische  $P_2O_5$  wordt opgenomen. De diffusie van de waterdamp-moleculen uit de poriën van het object naar de  $P_2O_5$  verloopt in vacuo aanzienlijk sneller. In dit milieu blijft het weefsel minstens 14 dagen.

Wanneer wij nu deze methode toepassen op de tandweefsels, moeten wij ons voorstellen, dat na afloop van het proces al het water, dat eventueel in de permeabele structuren van glazuur en dentine aanwezig mocht zijn geweest, verdwenen is, zodat de droge kleurstof achterblijft.

2°. Voordat nu coupes van de tandweefsels gemaakt konden worden — waarbij water te pas komt — dienden wij opnieuw een verplaatsing van kleurstof te verhinderen. Hiertoe werd het glazuur doordrenkt met methyl-methacrylaat, waarin de kleurstof onoplosbaar is. Het monomeer hiervan is dun-vloeibaar en dringt daardoor snel in. Na 14 dagen werd het monomeer vervangen door een stroop-dikke gepraepolymeriseerde vorm van deze stof, terwijl na nogmaals 14 dagen de definitieve polymerisatie plaats vond (literatuur: P u c k e t t <sup>33</sup>).

Opdat het vries-droog-proces en de doordrenking met methyl-methacrylaat zo grondig mogelijk plaats kon hebben, was het wenselijk, dat de elementen in kleine stukjes werden verdeeld. Dit werd trouwens ongewild meestal reeds door afkoeling in vloeibare lucht bereikt.

3°. Volgens een nader te beschrijven methode (J a n s e n) werden nu coupes gezaagd tot een dikte van  $80 \mu$ , die vervolgens werden dungslepen tot dikten van  $20-5 \mu$ .

### *Fluorescentie-microscoop*

De gebruikte U.V.-lichtbron bestond uit een met water gekoelde super-hoge druk-kwiklamp, Philips S.P. 500. Het licht van deze lamp werd door een uit kwartslenzen vervaardigd stelsel evenwijdig gericht en in een filter-combinatie — bestaande uit een 5 cm. lange, met water gekoelde  $CuSO_4$ -cuvette en een nikkel-oxyde glas — van het zichtbare licht en van straling van nog grotere golflengte ontdaan.

Het microscoop was voorzien van een gealuminiseerde spiegel en een kwarts-condensor. Niet-fluorescerende objectglazen werden gebruikt en euphos-dekglasjes, die verhinderden, dat U.V.-licht

stralen de lenzen van het microscoop binnendrongen. Als onderzoek-medium bleek paraffine-olie het best te voldoen.

## Resultaten

A. *Coupes van ongekleurde tanden.* Coupes van contrôle-elementen leerden ons, dat het glazuur bij de door ons gevolgde methode een veel minder sterke eigen fluorescentie bezit dan dentine, praedentine en pulpa. Het glazuur bleek zwak donkerblauw te fluoresceren, terwijl de dentine — zelfs in dunne lagen — een licht hemelsblauwe fluorescentie vertoonde. De eigen fluorescentie van praedentine en pulpa en meestal ook die van de korrelaag in de dentine was blauwgroen\*).

Bij sterke vergroting was het in de regel niet mogelijk, in het glazuur iets van de details waar te nemen, die voor de coupes van de gekleurde tanden veelal zo kenmerkend waren. In één geval konden wij in de coupe van een contrôle-tand bij sterke vergroting de prismatekening waarnemen, doordat het prismalichaam zwak oplichtte in een grijzige tint. In dit geval fluoresceerden de interprismatische stof en de prismascheden veel minder helder dan het prismalichaam.

B. *Coupes van gekleurde tanden.* Wat deze coupes betreft maakte het geen principieel verschil of de honden op de eerste dan wel op de tweede manier waren behandeld (pag. 229). In nagenoeg alle gevallen bleek de kleurstof te zijn doorgedrongen in glazuur en dentine, zelfs in die gevallen, waarbij de kleurstof (op melkelementen!) slechts gedurende enkele minuten geapliceerd was geweest. Merkwaaardigerwijze zagen wij enkele malen zowel in melk- als blijvende elementen, dat de kleuring van de dentine sterker was dan in het bovenliggende glazuur. Deze ervaring hadden wij reeds opgedaan bij proeven met methyleenblauw in vitro. In geen van deze gevallen konden wij een beschadiging of andere afwijking van het glazuur vaststellen, die dit verschijnsel zou kunnen verklaren. Dat beschadiging van het glazuur-oppervlak een sterker binnendringen van de kleurstof ten gevolge heeft, namen wij waar bij een element, dat tijdens de praeparatie van de buurtand plaatselijk door de boor

\*) Bij één hond zagen wij in het glazuur van het contrôle-element een vuil-gele fluorescentie, die in grote trekken dezelfde localisatie te zien gaf als bij de gekleurde praeparaten nog ter sprake zal komen. Het spreekt vanzelf dat coupes van de met trypaflavine gekleurde tanden van hetzelfde dier niet voor dit onderzoek konden dienen. De geel-groene fluorescentie van trypaflavine was n.l. niet met voldoende zekerheid van deze abnormale fluorescentie te onderscheiden.



zeer licht beschadigd was: de kleurstof was ter plaatse duidelijk sterker binnengedrongen. Of deze sterkere kleuring toegeschreven moet worden aan een verhoogde permeabiliteit door de beschadiging of aan retentie van kleurstof ter plaatse, moeten wij in het midden laten.

De nu volgende beschrijving der microscopische beelden heeft betrekking op de verdeling der kleurstoffen in het glazuur, terwijl slechts terloops melding gemaakt zal worden van eventuele doordringing in de dieper gelegen weefsels. De waarnemingen in dentine en pulpa worden trouwens bij gebruik van trypaflavine onzekerder door kleur en sterkte van de eigen fluorescentie dezer weefsels.

De kleurstof bleek over het algemeen niet gelijkmatig over de dikte van het glazuur te zijn verdeeld; men kon op dwarsdoorsneden drie lagen waarnemen. Er was vrijwel steeds een sterker gekleurde middenzone, die door een nagenoeg ongekleurde zone gescheiden was van de glazuur-dentine-grens; ook de buitenste zône bevatte minder kleurstof, doch de grens tussen deze en de middenzone was veel vager dan die tussen de middenzone en de aan de dentine grenzende laag. Bovendien zagen wij dikwijls, hoe het buitenste laagje van de buitenzone met kleurstof als het ware doordrenkt leek (fig. 1 en 2). Ter oriëntatie diene, dat de middenlaag ongeveer samenviel met het gebied, waar de Hunter-Schregerlijnen doorgaans het duidelijkst zijn.\*)

Onafhankelijk van de genoemde zones brengen ook de lijnen van R e t z i u s laagsgewijze ophopingen van kleurstof teweeg, die eveneens op dwarsdoorsneden door het element ongeveer evenwijdig aan het glazuuroppervlak lopen, doch deze lijnvormige kleurstofophopingen zijn veel smaller dan de reeds genoemde zones en zij komen veel minder regelmatig voor. Loodrecht hierop staan de lamellen (fig. 2), die wij reeds bij zwakke vergrotingen van dwarsdoorsneden als helder geelgroene lijnen door het glazuur zagen verlopen (barsten, die tijdens het zagen en slijpen der coupes waren opgetreden, fluoresceerden niet). Ter weerszijden van de lamellen zagen wij soms een smalle zone, waarin het glazuur minder kleurstof bevatte dan elders. Soms ontsprongen uit de lamellen

---

\*) Mogelijk moet de sterkere kleuring van de middenzone niet worden toegeschreven aan wijdere banen, doch aan het feit, dat deze zone in het glazuur meer prisma-doorsneden bevat dan de buitenste zone, waar de prisma's ongeveer evenwijdig aan de coupe lopen (zie S t a z<sup>37</sup>). Het grote verschil in kleuring tussen de middenzone en de aan de dentine grenzende zone kan echter o.i. op deze wijze niet worden verklaard.

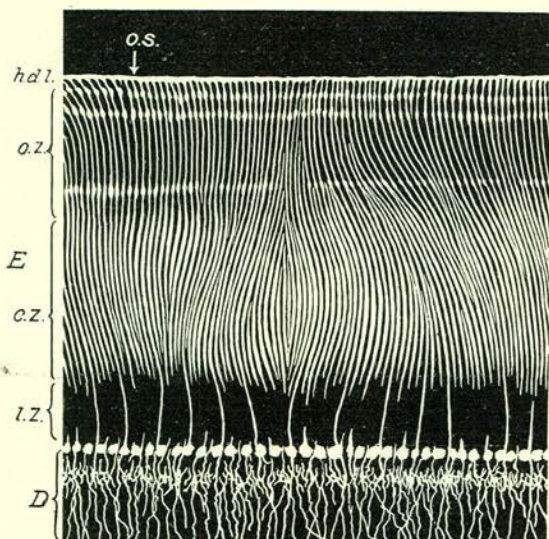


Fig. 1

Transversale doorsnede door glazuur (E) en dentine (D) van een blijvende hoektand van een hond. Kleuringstijd: 2 dagen. De prismascheden van aangrenzende prisma's zijn slechts door een enkelvoudige lijn weergegeven.

o.s. = buitenoppervl. glazuur

h.d.l. = homogeen gekleurd buitenste laagje v.h. glazuur

c.z. = midden-zone

o.z. = buiten-zone

i.z. = binnen-zone (de beide laatste zijn minder intensief gekleurd dan de midden-zone).

N.B. In de buitenzone zijn Retziuslijnen waarneembaar; de witte stippen in de buitenlaag van de dentine stellen de z.g. korrellaag voor.

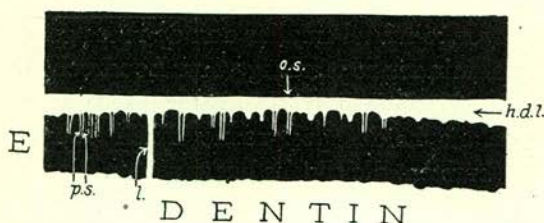


Fig. 2

Zeer dunne transversale coupe van melkhoektand van een hond, nabij de cervicale grens v. h. glazuur. Kleuringstijd: 5 minuten

E = glazuur

o.s. = buitenopp. v. glazuur

h.d.l. = homogeen gekleurde buitenlaag

p.s. = prismascheden van twee aangrenzende prisma's, waartussen de ongekleurde interprismatische stof

l. = lamel

takjes, die zich verloren in het glazuur. Opmerkelijk was, dat de lamellen in alle vroeger genoemde zones even sterk gekleurd waren. Waar zij de glazuur-dentine-grens bereikten, kon men een plaatselijke ophoping van de kleurstof in de dentine waarnemen.

Bij het bestuderen van de coupes blijkt, dat men duidelijker beelden krijgt, naarmate de coupes dunner zijn. Sterk gekleurde praeparaten kunnen derhalve het best met olie-immersie worden bekeken op plaatsen, waar het glazuur één prismalaag (d.i.  $\pm 5 \mu$ ) dik is. In zwakker gekleurde praeparaten ziet men bij een dergelijke dikte echter niet voldoende.

Bij sterke vergroting zagen wij het volgende:

1°. In de meeste gevallen, ook bij de langste applicatieduur, bleek de kleurstof uitsluitend gelocaliseerd te zijn in de prismascheden. In deze gevallen namen wij op de grens tussen twee ongekleurde prisma's — zowel op lengte- als op dwarsdoorsnede — de twee groene lijnen der beide prismascheden waar, die de ongekleurde interprismatische stof tussen zich sloten. \*) (Fig. 2). Men zag de gekleurde prismascheden op deze wijze vooral duidelijk in de middenzone, zo nu en dan echter ook in aansluiting aan het sterk gekleurde oppervlakkige laagje van de buitenzone en in de uitwaaierende zijtak van een lamel.

2°. Het bovengenoemde, homogeen gekleurde, meest oppervlakkige laagje van de buitenste glazuurzone bleek bij sterkere vergroting geen differentiatie in prisma's, prismascheden of interprismatische stof toe te laten. Dat het laagje wel degelijk tot het glazuur behoorde bleek bij het afwisselend bezien met wit licht en ultraviolet licht: in het witte licht waren de prisma's er wèl in te onderscheiden. Wij moeten dus aannemen, dat in dit oppervlakkige laagje het glazuur homogeen gekleurd was. In de oneffenheid van de binnenbegrenzing ervan was geen samenhang te zien met de daaruit „ontspringende" prismascheden (Fig. 2).

3°. In de onderste — d.i. aan de dentine grenzende — zone van het glazuur was de kleurstof, behalve in de lamellen, in hoofdzaak slechts zichtbaar in lijnen, die loodrecht op de glazuur-dentine-grens stonden. Zij onderscheidden zich van de prismascheden, doordat zij:

\*) Dit beeld was regel; slechts éénmaal zagen wij in praeparaten van twee elementen van eenzelfde hond, die verder het beschreven beeld vertoonden, hoe plaatselijk ook de prismalichamen gekleurd waren (wellicht plaatselijke hypoplasie van het glazuur).

- a. niet als dubbele lijntjes werden gezien (zoals twee prismascheden ter weerszijden van een laagje interprismatische stof);
- b. in het algemeen helderder gekleurd waren (als waren het kleine lamellen);
- c. op veel grotere afstand van elkander waren gelegen, dan overeenkwam met de prismabreedte (Fig. 1).

Op grond van het aspect van deze lijnen in wit licht zijn wij geneigd, ze te beschouwen als delen van tufts, die overigens bij honden niet zeer duidelijk waarneembaar zijn. Voorts zagen wij soms wel, soms geen samenhang van de in het glazuur binnendringende groen fluorescerende dentinekanaaltjes met de groen gekleurde lijnen in dit gebied van het glazuur.

4°. De gekleurde Retzius-lijnen werden, voorzover wij konden nagaan, gevormd door de aaneenschakeling van op gelijke hoogte gelegen verdikkingen in de groene prismascheden. Van een bajonetvormige afknikking van de prismalichamen (Gustafson<sup>20</sup>) hebben wij niets gezien.

Bovengenoemde beelden hebben hoofdzakelijk betrekking op kleuringstijden tussen 15 en 20 minuten, voorzover het tenminste praeparaten betrof, die met in trypaflavine gedrenkte watten gekleurd waren (pag. 229). Zoals gezegd, werden geen principieel andere beelden gezien bij de oudere honden, die volgens de eerste methode, d.i. door middel van contactvullingen waren behandeld, hoewel bij de laatste de kleuring van de lamellen en hun „vertakkingen” door de zwakkere kleuring van de rest van het glazuur overheerste.

Bij de korte kleuringstijden waren de beelden in principe eveneens gelijk aan de reeds beschrevene. Duidelijke kleuring van de prismascheden tot aan de glazuur-dentine-grens zagen wij zelfs nog na applicatie van de kleurstof gedurende slechts 2 1/2 minuut. Blijkbaar kan de kleurstof in deze korte tijd door de gehele dikte van het glazuur van melkelementen van honden heendringen.

### *Discussie*

Zoals wij in de inleiding reeds memoreerden, hebben wij die structuren, die tijdens de proef door trypaflavine gekleurd werden, permeabel genoemd. Wij dienen evenwel te bedenken, dat in het glazuur heel wel permeabele structuren aanwezig kunnen zijn, die niet door de trypaflavine-moleculen werden bereikt, of waaruit de kleurstof, in weerwil van de genoemde voorzorgs-

maatregelen verloren was gegaan. Met inachtneming van deze restrictie menen wij uit onze resultaten te mogen besluiten, dat door kleuring van het glazuur van buiten af in de *normale*, onaangetaste melk- en permanente elementen van honden de volgende permeabele structuren aantoonbaar zijn 1° *Prismascheden*, 2° *Lamellen*, 3° *Tufts*.

Analoge proeven werden verricht door F i s h <sup>16</sup>. Deze onderzoeker had bij jonge honden gelijksoortige resultaten, doch hij gebruikte een hermetisch over de tanden sluitende kap, zodat de omstandigheden voor deze elementen zeker niet normaal genoemd kunnen worden. Bovendien meende F i s h de permeabiliteit alleen in het glazuur van jonge honden te moeten aannemen, terwijl wij ook permeabele structuren bij oudere dieren vaststelden.

K a n n e r <sup>25</sup> deed zijn proeven op mensen onder correcte voorzorgen voor het behoud van normale omstandigheden der te onderzoeken elementen. Hij nam een penetratie van het glazuur waar doch vermeldt helaas geen banen. Met nadruk beschrijft hij het ontbreken van de kleurstof in de dentine en hij ziet dientengevolge de glazuur-dentine-grens als een membraan (zie ook W a n n e n m a c h e r <sup>44</sup> bij „proeven met  $\text{AgNO}_3$  in vitro”). Deze opvatting werd door onze experimenten niet bevestigd.

W a n n e n m a c h e r <sup>44</sup> en B e r g g r e n <sup>5</sup> gebruikten fluoresceïne en methyleenblauw. Zij appliceerden hun kleurstoffen op correcte wijze, doch zij konden bij menselijke elementen geen penetratie vaststellen. Dit geldt ook voor L e f k o w i t z en B o d e c k e r <sup>27</sup> bij proeven met  $\text{KMnO}_4$  op hondentanden. Laatstgenoemde auteurs gingen zelfs zover, dat zij meenden te hebben aangetoond, dat kleurstoffen niet van buiten af in normaal glazuur kunnen dringen.

Onze bevindingen geven geen enkele aanwijzing dat in het glazuur in vivo nog andere banen zouden bestaan dan die, welke bij proeven in vitro door verschillende auteurs zijn aangetoond. Aldus doet zich de paradoxale omstandigheid voor, dat onze microscopische onderzoeken eerder physiologische dan morphologische gegevens opleverden: de banen, die reeds uitvoerig bij geëxtraheerde of anderszins beschadigde elementen beschreven waren, worden onder normale omstandigheden inderdaad door tryptaflavine als permeabele structuren benut.

Overigens laten onze resultaten geen verdere conclusies ten aanzien van de physiologie van het glazuur toe. Daar tryptaflavine in de

normale mond niet voorkomt, kunnen wij aan onze microscopische beelden niet zien, of langs de gevonden banen normaliter een transport van stoffen plaats vindt. Hoogstens kan men nu aannemen, dat stoffen, die fysisch-chemisch zich analoog met trypaflavine gedragen en uit moleculen van gelijke of geringere grootte bestaan, het glazuur zullen binnendringen. Wij kunnen niet aangeven, welke stoffen dat zijn.

Ook ten aanzien van de drijvende kracht kunnen wij op grond van onze proeven niet tot een beslissende uitspraak komen: immers de verplaatsing van kleurstofmoleculen van het oppervlak van het glazuur tot in de diepte zou de resultante van het diffusievermogen dezer moleculen en een vloeistofstroom kunnen zijn. Het is zelfs denkbaar, dat de snelheid van diffusie groter is dan die van een eventueel naar het oppervlak van het glazuur gerichte vloeistofstroom, als gevolg waarvan de moleculen — de tegenstroom ten spijt — toch in de diepte van het glazuur terechtkomen. Zolang over de relatie tussen de grootte der kleurstofdeeltjes en de wijdte der „banen” niets naders bekend is, geven de door ons gevonden korte kleuringstijden geen basis voor een uitspraak in deze. Voor een quantitatief onderzoek op dit gebied zouden wij moeten kennen *a.* de grootte der deeltjes, *b.* de wijdte der banen, *c.* de aard van de zich in deze banen reeds bevindende moleculen. Bovendien wordt het probleem gecompliceerd door een mogelijke wisselwerking tussen trypaflavine en de inhoud of de „wanden” van de permeabele structuren.

Men moet dan ook uiterst voorzichtig zijn wanneer men de verplaatsing van kleurstoffen als vloeistofstroom of diffusieproces wil interpreteren.

In het licht van bovenstaande overwegingen is het duidelijk, dat uitspraken over de fysiologie van het glazuur, die gebaseerd zijn op de resultaten van kleuringsproeven als zodanig, als zinloos moeten worden beschouwd. Geheel verwerpelijk is het natuurlijk, uit dergelijke proeven te besluiten tot de vitaliteit van glazuur, zelfs wanneer het glazuur zich *in vivo* anders zou gedragen dan *in vitro* (wat uit onze proeven niet gebleken is). Immers alleen uit het verschijnsel der permeabiliteit mogen wij niet de aanwezigheid van protoplasma afleiden. En slechts aan protoplasma mogen wij vitaliteit toekennen! Een verantwoorde uitspraak over de fysiologische processen van het glazuur is slechts dan mogelijk, wanneer fysiologen en morfologen, gewapend met de nodige zelfbeperking,

ieder op hun terrein bijdragen geleverd hebben. Als een zodanige bijdrage is bovenstaand artikel bedoeld.

## SAMENVATTING

Men moet een groot deel van de verwarring, die betreffende het probleem van de permeabiliteit van het glazuur in de literatuur heerst, toeschrijven aan het feit, dat vele onderzoekers zich niet voldoende rekenschap hebben gegeven van de grenzen van hun methoden van onderzoek. Wij trachtten dan ook in de eerste plaats het permeabiliteitsprobleem te ontleden en bespraken de moeilijkheden, die rijzen, wanneer men het probleem in zijn geheel experimenteel tracht aan te vatten.

Vervolgens stelden wij de mogelijkheden en de grenzen van een onderzoek met kleurstoffen op onbeschadigd glazuur van hondentanden in vivo vast. De redenen waarom dit onderzoek werd uitgevoerd met trypaflavine, een fluorescerende kleurstof, en de maatregelen, die werden genomen teneinde verplaatsing van de kleurstof na extractie te verhinderen, werden uitvoerig besproken.

Het onderzoek leidde tot het resultaat, dat trypaflavine het onbeschadigde glazuur van hondentanden (zowel uit het blijvende als uit het melkgebit) binnendrong. De kleurstof werd aangetoond in de prismascheden, de tufts en de lamellen.

Na applicatie gedurende slechts 2 minuten met een 0,5% oplossing van trypaflavine bleek de kleurstof tot in de diepte van het glazuur van een melkcaninus van een hond te zijn doorgedrongen.

De aandacht werd gevestigd op het feit, dat dit onderzoek weliswaar geen nieuwe morphologische gegevens aan het licht bracht, doch dat het voor het eerst het bewijs leverde, dat bovengenoemde structuren in het glazuur onder normale omstandigheden inderdaad permeabel zijn.

Tenslotte werden enige problemen besproken, die door dit onderzoek werden opgeworpen, doch niet opgelost.

## SUMMARY

Much of the confusion in literature concerning the permeability of enamel must be ascribed to the failure of many authors in observing the limitations of the methods they used.

First of all, therefore, we tried to divide the problem of permeability in several parts and we discussed the technical difficulties encountered if one tries to cover the problem in its entirety.

Next, the possibilities and the limitations of an investigation with dyes applied on unimpaired enamel were given.

The reason why trypaflavin, a fluorescent dye, was chosen and the measures taken in order to prevent dislocation of the dye during the preparation of the specimens were discussed in detail.

The results were that trypaflavin permeated unimpaired enamel of dogs' deciduous (and, to a somewhat lesser extent, permanent) teeth. It was found in the prism sheaths, the tufts, and the lamellae.

After an application of 2 minutes' duration of a  $\frac{1}{2}$  per cent trypan-flavin solution the dye was found to have permeated the whole depth of the enamel cap of a dog's deciduous canine.

It was stressed that, although this investigation did not yield new morphological data, it certainly proved for the first time that the above-mentioned structures of the enamel really can act as channels of permeability under normal circumstances.

Finally, some problems arising from but not solved by this investigation were discussed.

## RÉSUMÉ

Il faut, pour une grande partie, attribuer la confusion qui règne dans la bibliographie au sujet du problème de la perméabilité de l'émail des dents, au fait que beaucoup d'auteurs ne se sont point rendu compte des limites de leurs méthodes d'examen. C'est pour cela que nous nous sommes attachés en premier lieu à analyser le problème de la perméabilité et avons parlé des difficultés qui surgissent quand on s'attache à comprendre l'ensemble du problème sous un jour expérimental.

Ensuite, nous avons déterminé les possibilités et les limites d'une étude entreprise in vivo, avec des substances colorantes, sur l'émail intact des dents de chien. Nous nous occupons amplement des raisons pour lesquelles ces recherches ont été effectuées avec de la trypanflavine, substance colorante fluorescente, et des mesures prises dans le but d'éviter le déplacement de la substance colorante après extraction.

L'examen a conduit à la conclusion que la trypanflavine pénètre dans l'émail intact des dents de chien. La présence de la substance a été démontrée dans les gaines prismatiques, les buissons et les lamelles.

Nous avons constaté qu'après 2 minutes seulement d'une application de solution de trypanflavine à 0.5% la substance colorante avait pénétré, chez un chien, jusque dans la profondeur de l'émail d'une canine de lait.

Nous avons attiré l'attention sur le fait que, si cet examen n'a point mis en lumière de nouvelles données morphologiques, il a du moins prouvé pour la première fois que les structures précitées de l'émail sont en effet perméables dans des conditions normales.

Finalement, viennent quelques problèmes mis en question par de travaux, mais non point résolus.

## ZUSAMMENFASSUNG

Eine grosser Teil der Missverständnisse, die hinsichtlich des Problems der Permeabilität des Schmelzes in der Literatur herrschen, können auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass viele Wissenschaftler sich nicht genügend Rechenschaft von den Grenzen ihrer Untersuchungsmethoden gegeben haben.

Daher haben wir vor allem versucht, das Problem der Durchdringlichkeit zu analysieren und besprochen die Schwierigkeiten, die sich ergeben, wenn man versucht sich dem Problem als Ganzes experimentell zu nähern.



Danach stellten wir die Möglichkeit und die Grenzen einer Untersuchung mit Farbstoffen auf unbeschädigtem Schmelz von Hundezähnen in vivo fest.

Die Gründe, warum diese Untersuchung mit Trypaflavin, einem fluoreszierenden Farbstoff, ausgeführt wurden, und die Massnahmen die genommen wurden, um das Wandern des Farbstoffs nach der Extraktion der Zähne zu verhindern, wurden ausführlich besprochen.

Die Untersuchung führte zu dem Ergebnis, dass Trypaflavin in dem unbeschädigten Schmelz von Hundezähnen (sowohl beim bleibenden als auch beim Milchgebiss) eindrang.

Der Farbstoff wurde in den Prismascheiden, den Büscheln und den Lamellen nachgewiesen.

Nach Applikation mit einer 0,5% Trypaflavin-Lösung, während nur 2 Minuten, schien der Farbstoff bis in die Tiefe des Schmelzes des Milcheckzahns eingedrungen zu sein.

Es wurde auf die Tatsache hingewiesen, dass diese Untersuchung zwar keine neuen morphologischen Gesichtspunkte ans Licht gebracht hatte, doch dass diese zum erstenmal den Beweis geliefert hat, dass die obengenannten Strukturen im Schmelz unter normalen Umständen tatsächlich durchdringbar sind.

Zum Schluss wurden einige Problemen besprochen, die sich aus dieser Untersuchung ergaben, aber nicht gelöst wurden.