

LAMORFA

Laboratoř morfologie
a forenzní antropologie

Mikroskopie tvrdých zubních tkání

Osnova přednášky

Světelná mikroskopie

Nastavení mikroskopu pro pozorování v procházejícím světle/polarizovaném světle

Digitální mikrofotografie

Stavba zubu, amelogeneze, růstové markery na zubech

Příprava histologického preparátu

Mikrostruktura tvrdých zubních tkání

Metoda odontochronologie

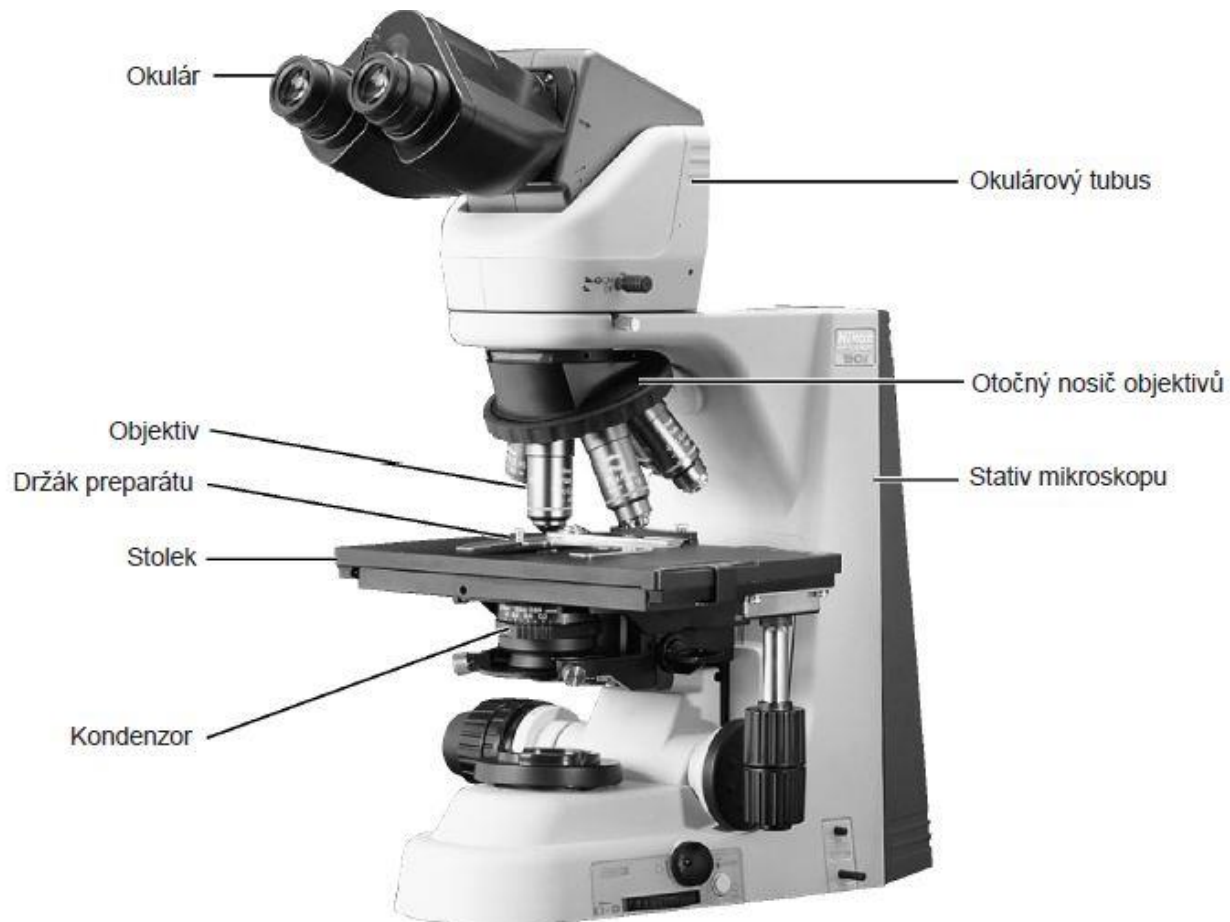
Praktické cvičení

Literatura

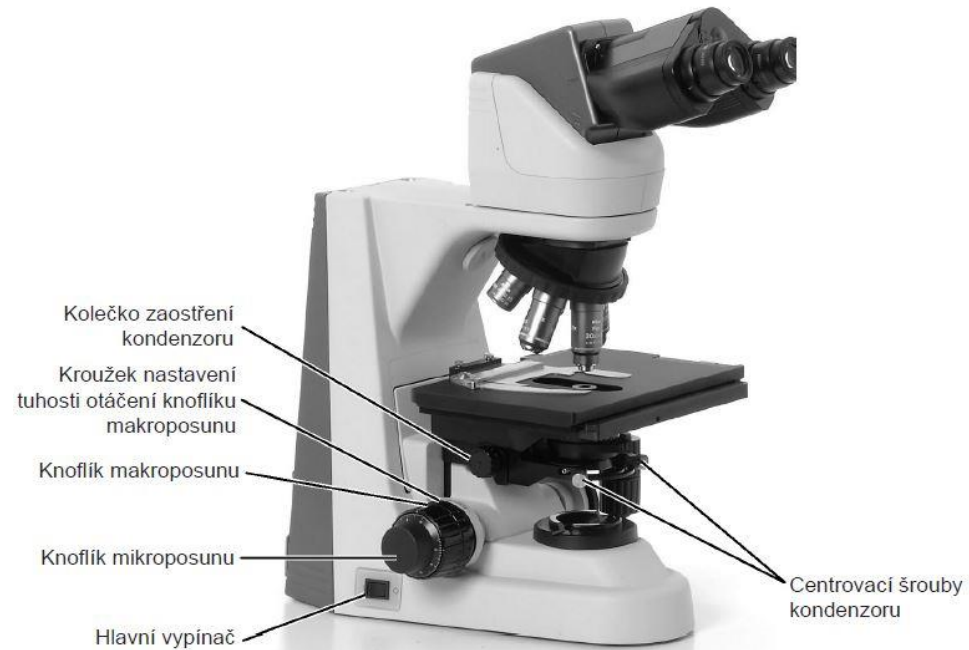
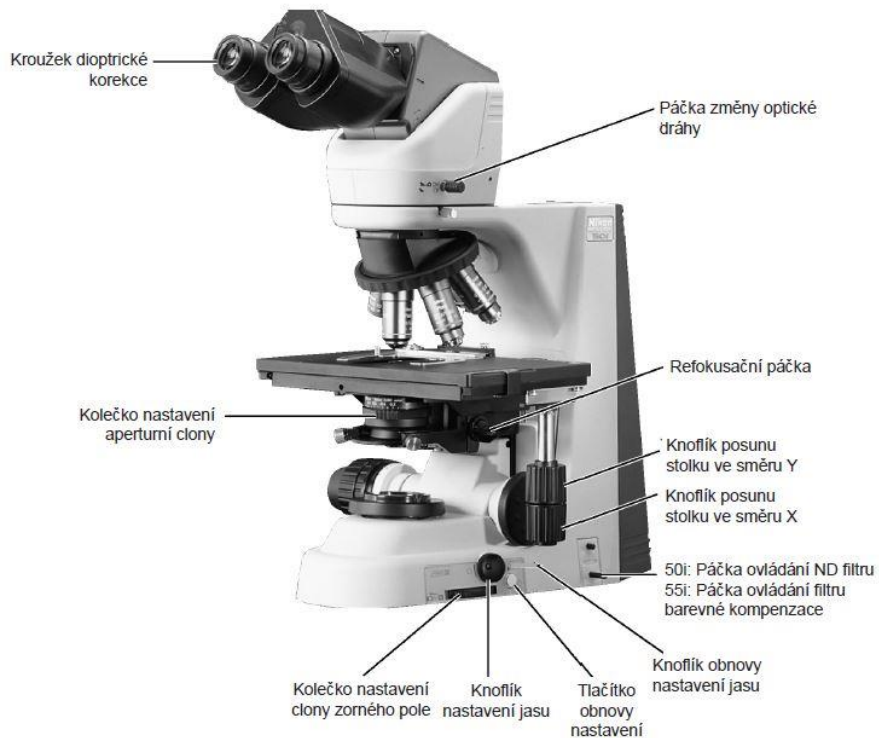
Světelná mikroskopie s procházejícím světlem

- Využívá spodního zdroje světla, které je soustředěno kondenzorem, prochází skrze tenký, průhledný/průsvitný vzorek, obraz jím vykreslený je zvětšen objektivem a pozorován přes okulár
- Možné zvětšení od 10x do cca 400x (kombinací okuláru a objektivu)

Hlavní části optického mikroskopu



Části používané k nastavení mikroskopu



Nastavení mikroskopu pro pozorování v procházejícím světle



Pomocí knoflíku zaostření kondenzoru kondenzor zdvihněte

1. Po zapnutí mikroskopu zvedněte kondenzor do nejvyšší polohy

Pomocí knoflíku nastavení aperturní clony aperturní clonu zcela otevřete

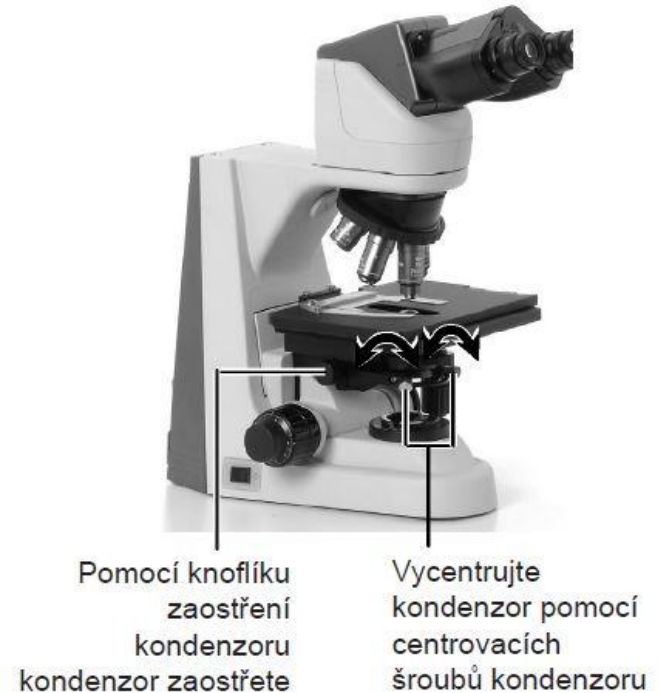
Pomocí knoflíku nastavení clony zorného pole clonu zorného pole zcela otevřete



2. Otevřete zcela clonu zorného pole a aperturní clonu.



- 3.** Do optické dráhy umístěte objektiv 10x. Preparát uchyťte, zafixujte v držáku a zaostřete na preparát pomocí knoflíku makro/mikroposunu



- 4.** Nastavte kondenzor (zaostřením a vycentrováním) tak, aby světlo procházející kondenzorem vytvořilo obraz na správném místě (ve středu optické dráhy) povrchu preparátu.

Nastavení kondenzoru

1. Zacroňte maximálně zorné pole.
2. Otáčejte kolečkem zaostření kondenzoru a vytvořte na povrchu preparátu obraz clony zorného pole.
3. Do optické dráhy umístěte objektiv 40x. Zaostřete preparát knoflíky makro/mikroposunu.
4. Otáčejte centrovacími šrouby kondenzoru tak dlouho, až se clona zorného pole objeví ve středu zorného pole okuláru. Nejsnadněji toho dosáhnete, jestliže nastavíte aperturu clony zorného pole o trochu menší, než je zorné pole okuláru.

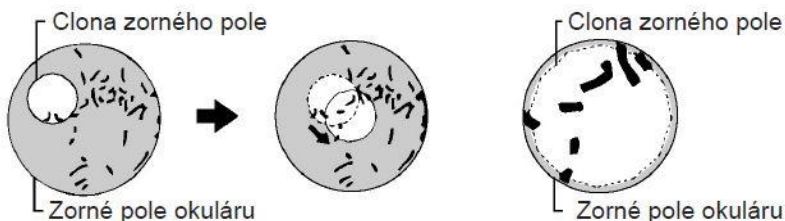


Otáčením kolečka clony zorného pole zacroňte clonu co nejvíce



Knoflík zaostření kondenzoru

Centrovací šrouby kondenzoru



Nastavení aperturní clony

Nastavení aperturní clony kondenzoru určuje rozlišení, jas, kontrast a hloubku ostrosti.

Zmenšení clony → snížení jasu a rozlišení, zároveň zvýšení kontrastu a hloubky ostrosti

Zvětšení clony → zvýšení jasu a rozlišení, zároveň snížení kontrastu a hloubky ostrosti

Aperturní clonu kondenzoru je **potřeba nastavit** pro každý preparát a aplikaci zvlášť

Optimální kontrast je dosažen, když bude aperturní clona kondenzoru zacloněna asi na 70 až 80 % maximální apertury objektivu.



Kroužek aperturní clony

Maximální numerická apertura je uvedena na boku objektivu

Plan 40X
40x / 0.75
∞ / -WD



$$0.75 \times 0.7 \sim 0.8 = 0.525 \sim 0.6$$

Nastavení clony zorního pole

Nastavení oblasti preparátu, která má být osvětlena

Clona zorního pole by měla být **trochu větší** než zorné pole

Příliš velká clona → parazitní světlo, nežádoucí světelný závoj a snížení kontrastu



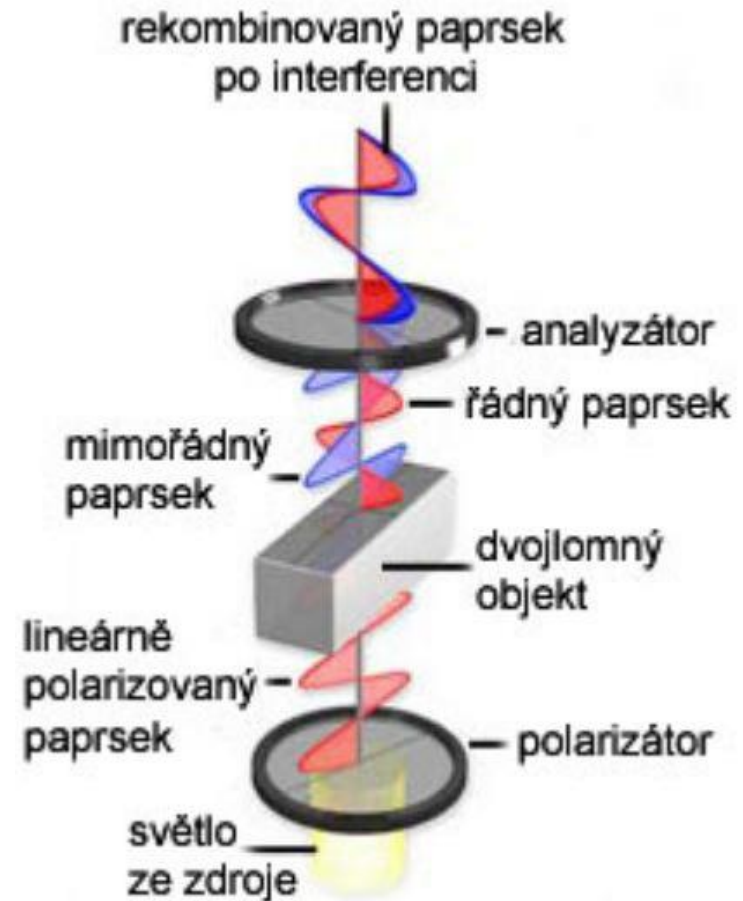
Kolečko clony zorného pole

Optický mikroskop s polarizací

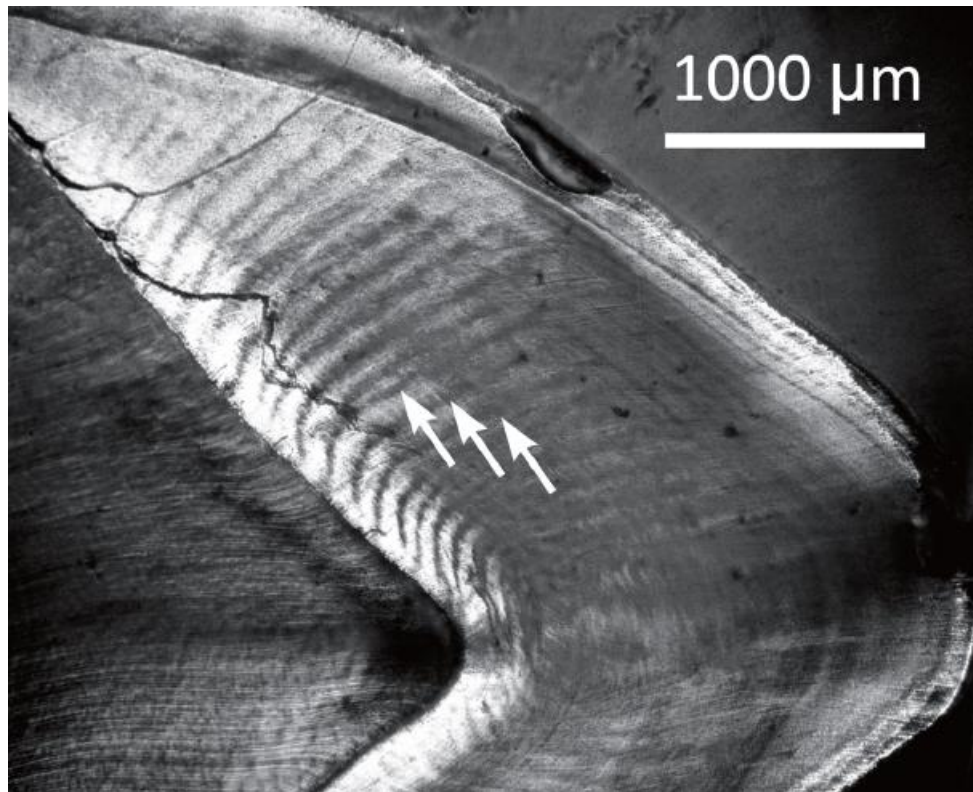
- Prochází-li světelný paprsek anizotropní látkou, dochází u něho ke změně, které říkáme polarizace
- Polarizační mikroskopie = využívá lineárně polarizované světlo získané pomocí polarizačních filtrů
- Lineárně polarizované světlo -> s využitím 2 polarizačních filtrů
 - Polarizátor – vložený do optické osi za polní čočku osvětlovací soustavy
 - Analyzátor – vložený před okulár
- **Anizotropní látka**
 - Její optické vlastnosti se liší podle směru, kterým v ní světlo prochází
 - Schopnost rozdělit procházející světelní paprsek na dvě části (dvojlom)

Optický mikroskop s polarizací

- Nastavíme-li polarizátor a analyzátor na největší jas, pak po vložení anizotropního objektu mezi tyto filtry nastane zeslabení obrazu a změní se jeho chromatičnost -> využití pro zobrazení struktur, které jsou při běžném pozorování neviditelné (hlavně pro pozorování stresových linií v dentinu)



Optický mikroskop s polarizací



Digitální mikrofotografie

Aby jsme mohli pozorované struktury analyzovat, je nutné vytvořit si jejich obrazový záznam

Nutné spojení kamery s mikroskopem – ideální **trinokulárová hlava mikroskopu** (2x okulár + 1x nadstavec na kameru)

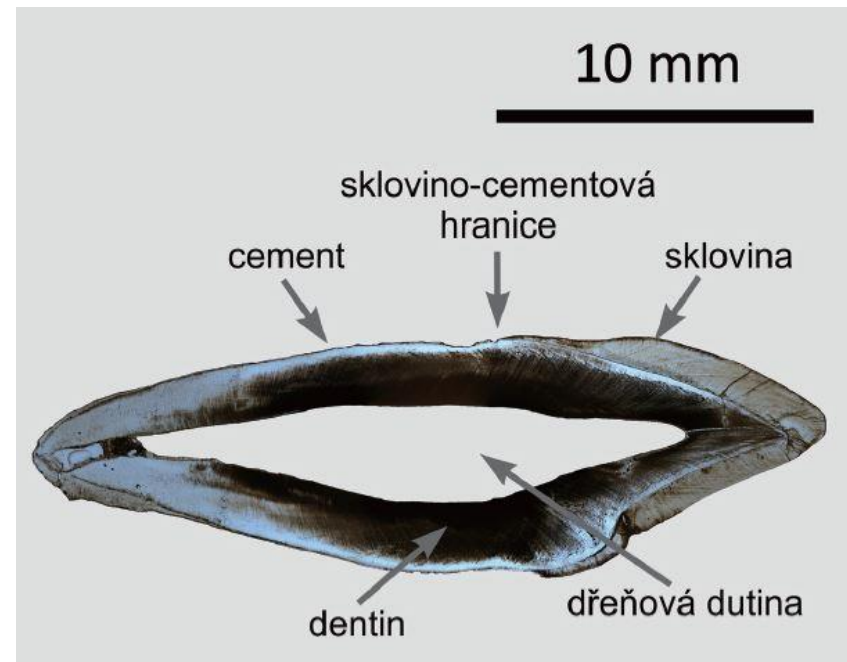
Potřebný software na digitální zpracování obrazu (NIS-Elements , Adobe Photoshop, ImageJ..)

Digitální obraz = reprezentace skutečného objektu v počítači

Stavba zubu

3 tvrdé zubní tkáně:

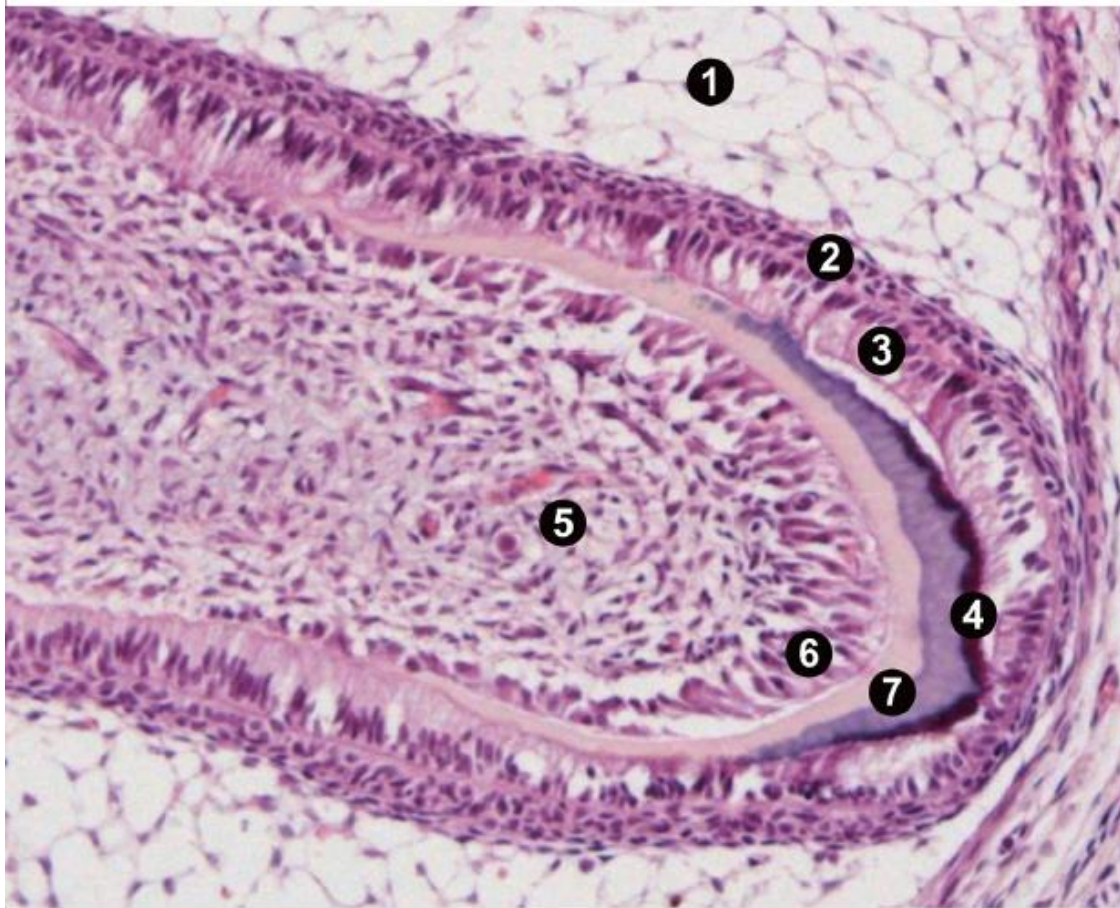
- Sklovina – kryje korunku
- Dentin – tvoří hlavní hmotu zubu
- Cement – kryje krček a kořen zubu



Amelogeneze

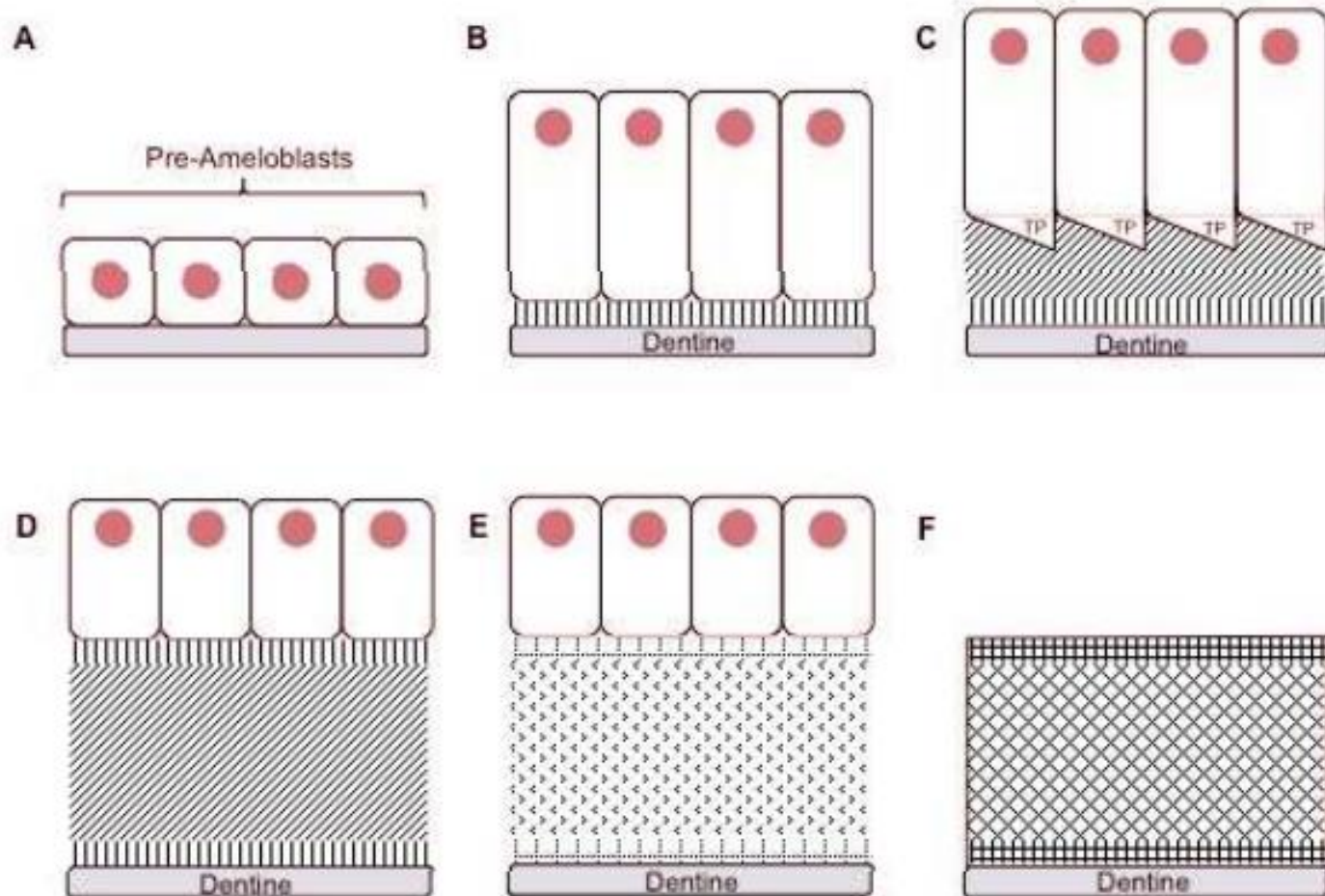


Amelogeneze



Detail základu zubu ve stádiu zubního zvonku na průřezu dolní čelisti lidského plodu (6. měsíc). *Pulpa skloviny* (1) sklovinného orgánu hraničí s buňkami *stratum intermedium* (2), na které nasedá vrstva *sekrečních ameloblastů* (3), produkujících *sklovinnou matrix* (4). Na povrchu *zubní papily* (5) se nachází *odontoblasty* (6), produkující *dentin* (7), v těsné blízkosti ještě *nemineralizovaný* (*predentin*), ve starší vrstvě dále od odontoblastů v blízkosti skloviny již *mineralizovaný*.
Zdroj: Dumková 2013

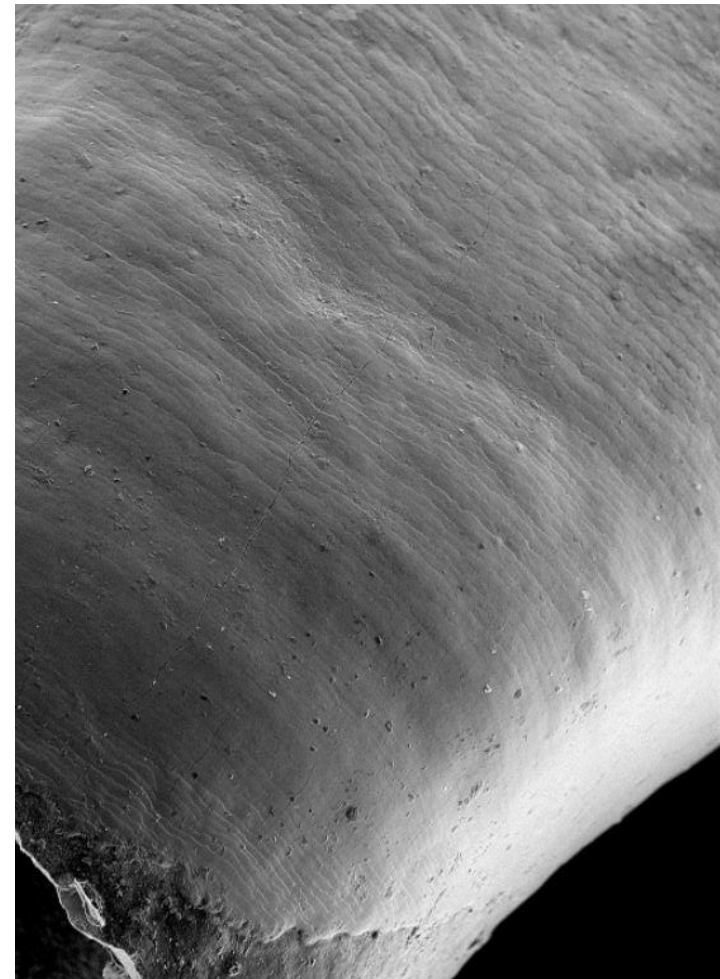
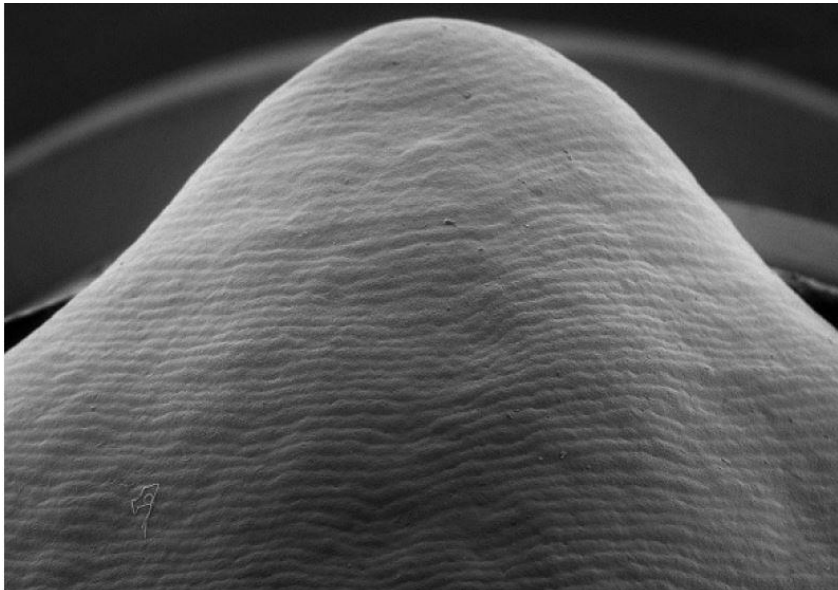
Amelogeneze



Mikroskopické markery rastu na zubech – povrch zubu

1. Perikymata

- Na povrchu skloviny
- Hlavně dětská dentice



Mikroskopické markery rastu na zubech – povrch zubu

2. Periadikulární proužky
 - Kořen
 - Nejsou viditelné na všech zubech (rozdílná tloušťka cementové vrstvy)



Mikroskopické markery rastu na zubech – histologický řez

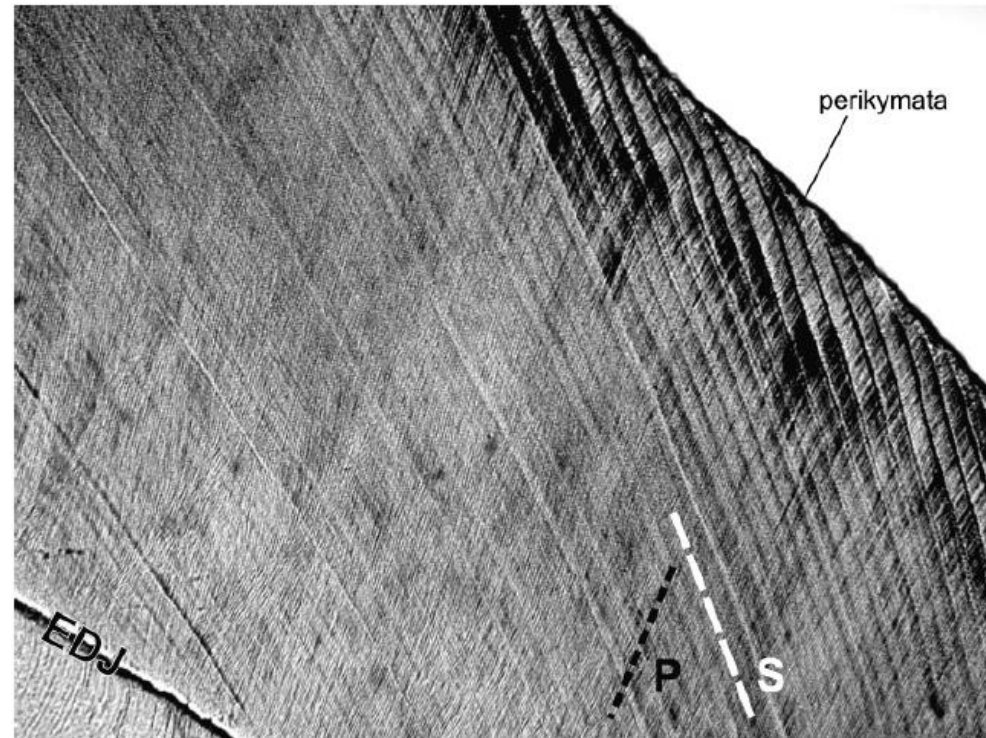
1. EDJ

- Hranice dentin-sklovina



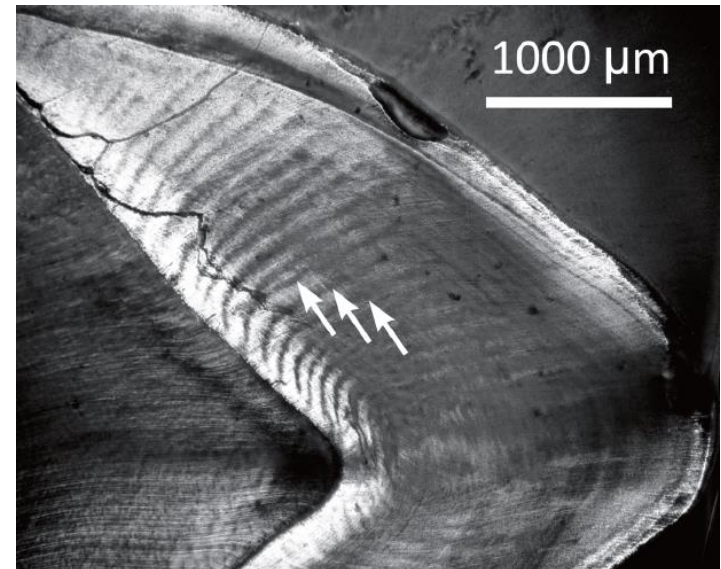
Mikroskopické markery rastu na zubech – histologický řez

2. Linie oddělující prismy
 - *Prism boundaries*
 - Od EDJ směrem ven
 - Důsledek amelogenezy



Mikroskopické markery rastu na zubech – histologický řez

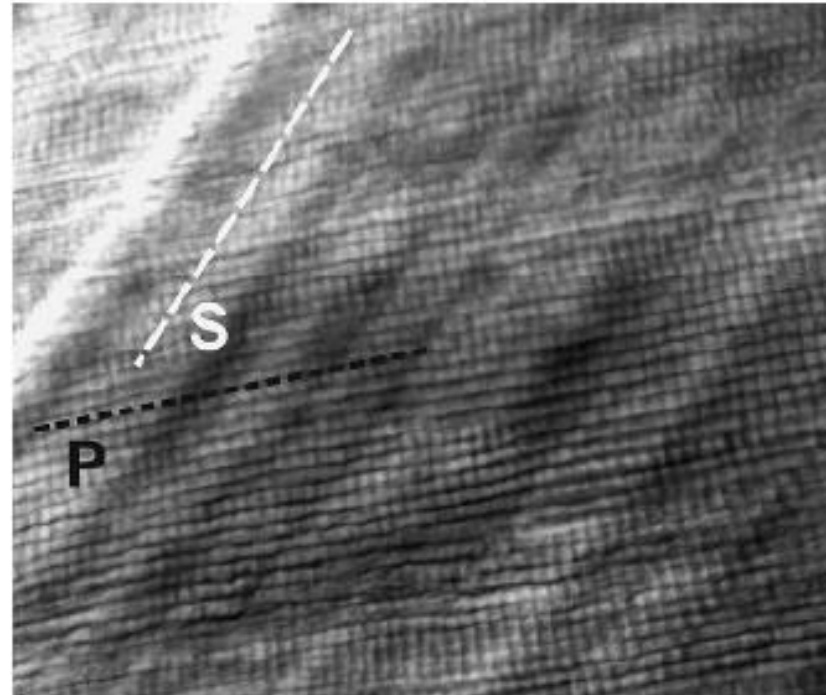
2. Linie oddělující prismsy
 - Pravidelné vlnění
 - Dekusace (hrbolek výrazně)
 - Hunter-Schregerovy proužky – skupinky různě se vlnících prizmat; koncentrovanější v namáhaných částech zubu



Mikroskopické markery rastu na zubech – histologický řez

3. Příčné linie

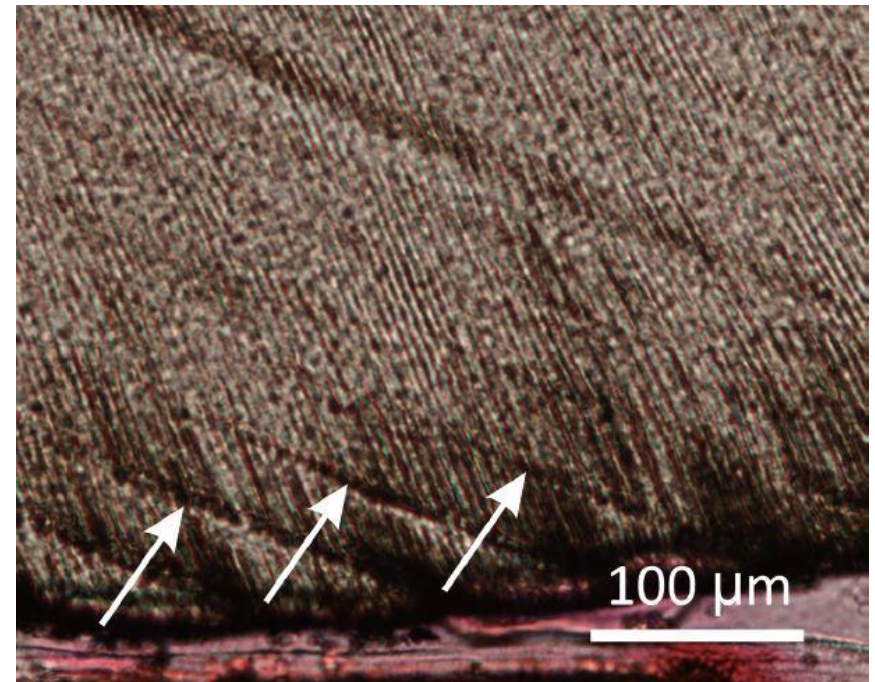
- *Prism cross striations*
- Napříč sklovinnými prizmaty
- „Textilní vzor“
- V různých částech skloviny různě vyvinuty – obtížná identifikace napříč jedním prizmatem
- Důsledek periodické denní sekrece matrix



Mikroskopické markery rastu na zubech – histologický řez

4. Retziusovy linie

- *Striae of Retzius*
- Diskontinuity ve sklovině
- Nejlépe viditelné hned pod povrchem korunky a u dospělé dentice
- Perikymata na povrchu



Histologický výbrus zubu

- *Přesnější odhad dožitého věku (nedospělí)*
- *Studium rastu korunky – CFT*
- *Stresové události a jejich chronologie*
- *Studium periodicity mezi CS a dvěma RL*
 - *Periodicita variabilní mezi taxonomy i mezi jednotlivci ale **individuálně je konzistentní***
 - *Vztah mezi velikostí těla a periodicitou (menší zvířata = kratší periodicity)*

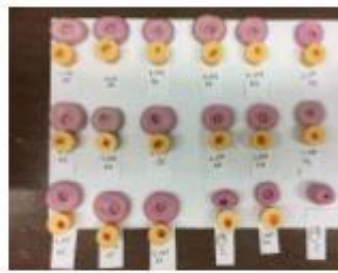
Histologický výbrus zubu

- nepodléhají remodelaci -> záznam o překonaném stresu viditelný po zbytek života -> velmi dobrý zdroj informací o překonané stresové zátěži
- odolnější vůči tafonomickým vplyvům
- cirkadiánní záznam ve struktuře tvrdých zubních tkání je pozorovatelný i v dospělosti a umožňuje rekonstrukci chronologie vývoje
- možnost rekonstruovat život minulých populací v archeologickém kontextu a poznávat evoluci lidského druhu v kontextu paleoatropologických nálezů

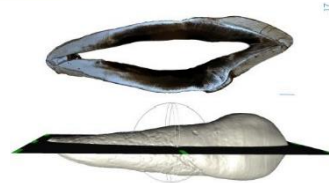
- nutnost brát ohled na opotřebování korunky věkem
- tvorba histologického preparátu je destruktivní metoda, nutná důkladná dokumentace vzorku (fotografická, 3D model, odlitek z pryskyřice)
- časově a finančně nároční postupy

Příprava histologického preparátu

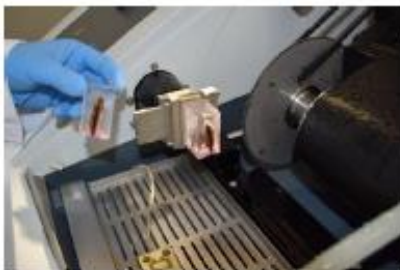
1. Výběr zubu a jeho dokumentace (fotografická, metrická, repliky, 3D model)



2. Zaznačení roviny řezu



3. Řezání, broušení, leštění na požadovanou tloušťku cca 100 μm

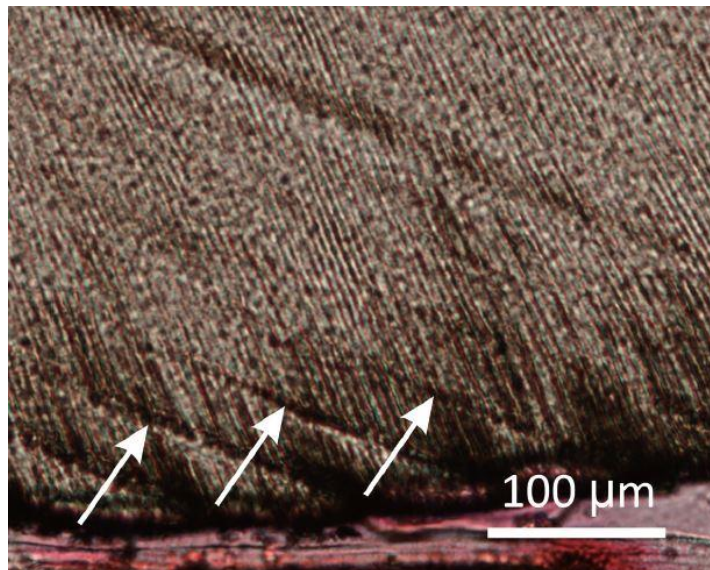


Mikrostruktura tvrdých zubních tkání

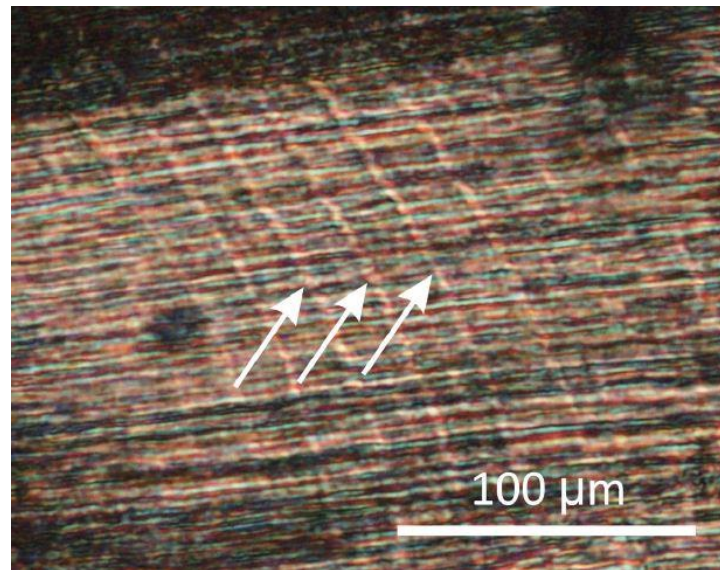
- Vývoj tvrdých zubních tkání probíhá v periodicky se opakujících intervalech -> v mikrostruktuře zubní skloviny a dentinu vznik charakteristických inkrementálních linií -> struktury ve sklovině a dentinu si vzájemně odpovídají
- Inkrementální linie:
 - *Krátkodobé* – vznikají v časovém intervalu 24 hodin
 - *Dlouhodobé* – vznikají delší periodě (dny)
- Inkrementální struktury jsou lépe viditelné v zubech trvalé dentice, v dentinu jsou viditelné hůř než ve sklovině

Dlouhodobé inkrementální struktury

- Individuálně konzistentní, ale vnitro- a mezidruhově variabilní periodicitata
- U člověka 6–12 dní, nejčastěji 8 nebo 9 dnů
- Ve sklovině označované jako **Retziusovy linie** -> na povrchu korunky v oblasti laterální skloviny se projevují jako perykymata
- V dentinu jako **Andresenovy linie**



Retziusovy linie



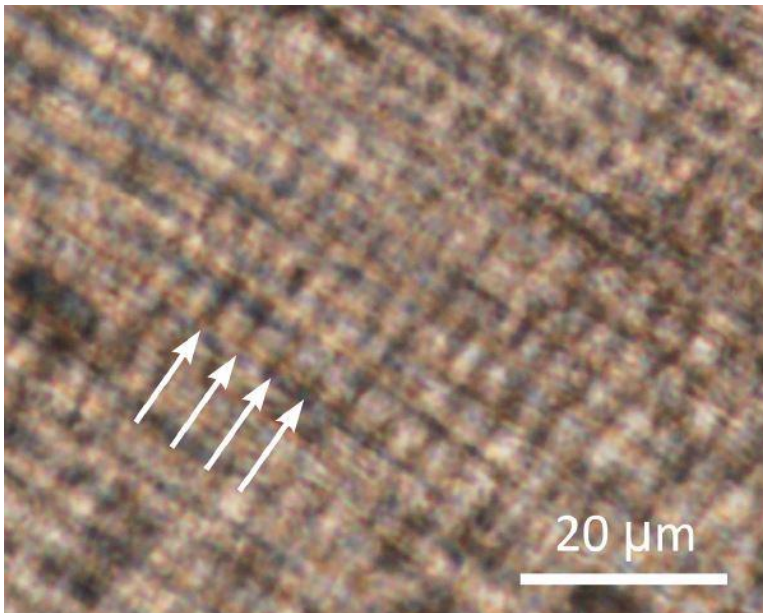
Andresenovy linie

Krátkodobé inkrementální struktury

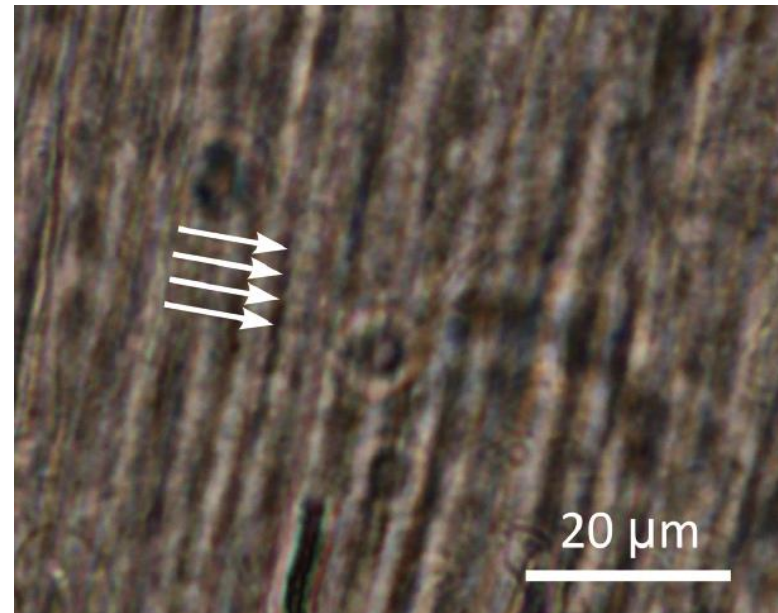
Vznik v časovém intervalu 24 hodin = denní přírůstky

- ve sklovině se označují jako *příčné linie*
- v dentinu jako *von Ebnerovy linie*

Jejich kvantifikace -> určení kolik dnů trvalo formování dané části zubu



Příčné linie



von Ebnerovy linie

Indikátory vývojového stresu

Zubní sklovina je vysoce specializovaná tkáň a velmi citlivá na fyziologické a environmentální změny.

V důsledku toho může být amelogeneze narušena systémovými vnějšími stresory, což vede k trvalým vadám skloviny

Tato narušení se zaznamenávají na mikroskopické úrovni jako **akcentované/stresové linie (AL)**

Jedná se o indikátory **nespecifického stresu** – u neznámých kosterních pozůstatků nelze spojit AL s konkrétní událostí



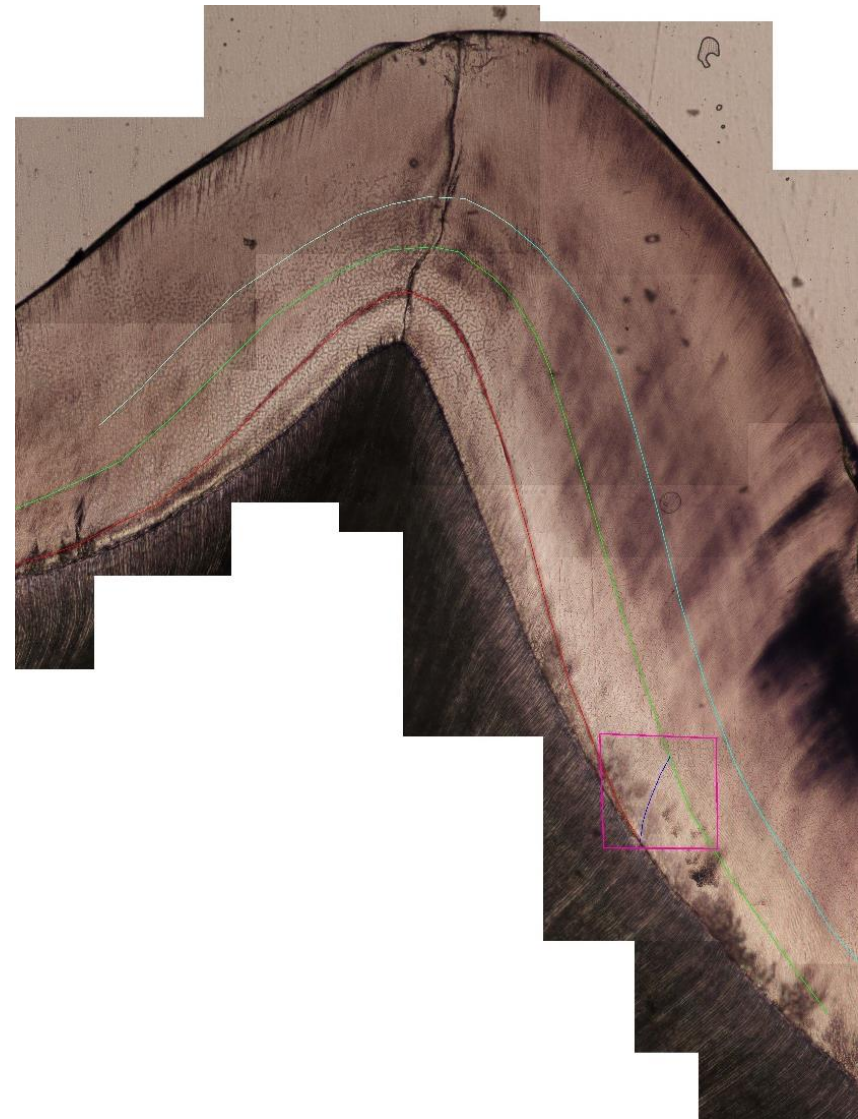
Neonatální linie

Výjimku představuje jedna specifická, velmi výrazná akcentovaná linie vznikající při porodu – **neonatální linie**

- umožňuje rekonstrukci chronologie vývoje
- odhad dožitého věku a časování stresových událostí
- pozorovatelná u všech prenatálně se vyvíjejících zubů = všechny zuby dočasného chrupu a většinou 1. trvalá stolička

Červená linie – neonatální

Zelená a **modrá** linie – stresové linie (AL)



Metoda odontochronologie

Pomocí počtu, rozměrů a vzájemných vzdáleností inkrementálních struktur lze charakterizovat vývojové parametry jako:

- Míra denní sekrece
- Periodicita dlouhodobých inkrementů
- Rychlost přirůstání kořene
- Délka formování korunky/kořene zubu

Metoda odontochronologie

Kvantifikací těchto proměnných lze určit rychlost a dobu utváření zubní korunky/kořene a charakter vývoje z hlediska životní historie. **U nedospělých jedinců** s neukončených vývojem chrupu v čase smrti zároveň a **odhad dožitého věku**

Neonatální linie – určuje počátek kalkulace absolutního času uplynulého od porodu – získaná data lze zasadit do chronologického rámce a zjistit chronologii zubního vývoje (věk v čase iniciace růstu korunky/kořene, délka formování korunky/kořene/ **věk** v čase ukončení formování korunky/kořene/zubu) **nezávisle na referenčních sbírkách.**

Komplexnější hodnocení působení vývojového stresu a rekonstrukce chronologie stresových událostí

Základní pojmy

Míra denní sekrece (ang. Daily Secretion Rate – DSR)

- Průměrná velikost přírůstku skloviny za 1 den (v μm) v určité oblasti zubu

Periodicita (v literatuře někdy Retzius periodicity – RP)

- Počet denních přírůstků mezi dvěma Retziusovými liniemi

Časování stresových událostí

- počet dní uplynulých od jedné stresové události k události následující

Délka formování korunky (angl. Crowt Formation Time – CFT)

- Počet dní/roků, během kterých byla vytvořena celá korunka

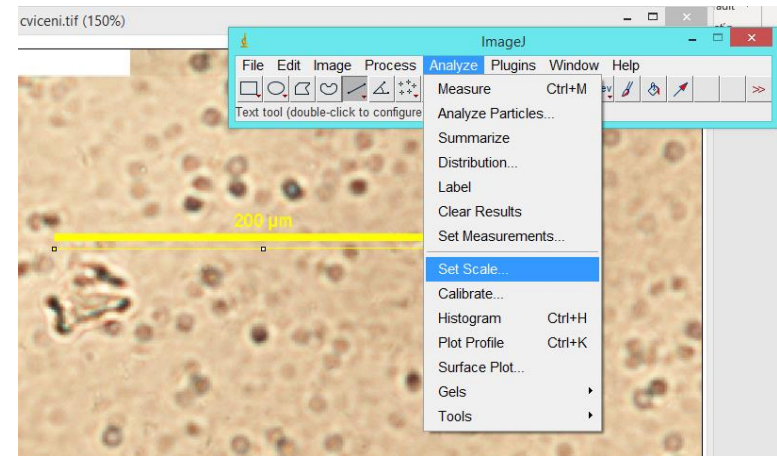
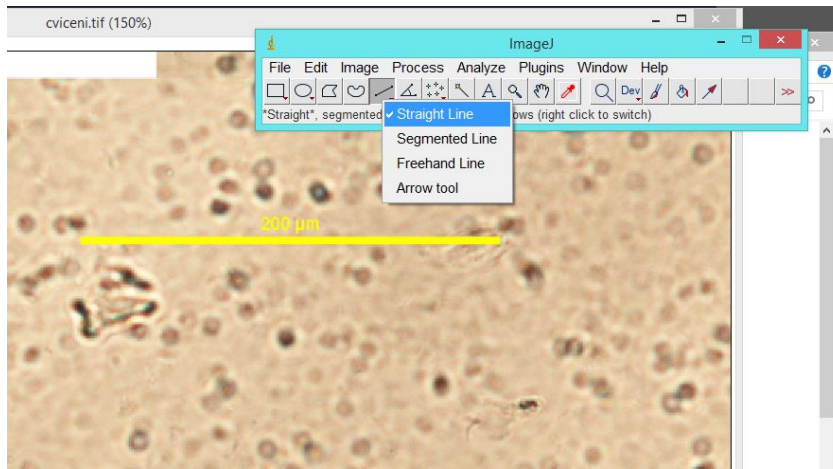
Praktické cvičení

Zjistěte:

1. *Periodicitu dlouhodobých inkrementálních struktur*
 2. *Míru denní sekrece = denní přírůstek = DSR (Daily Secretion Rate)*
 3. *Časování stresových událostí (chronologie)*
 4. *Délku formování korunky*
- *Zub -> Dolní trvalý řezák, archeologický nález, nedospělý jedinec (.tiff)*

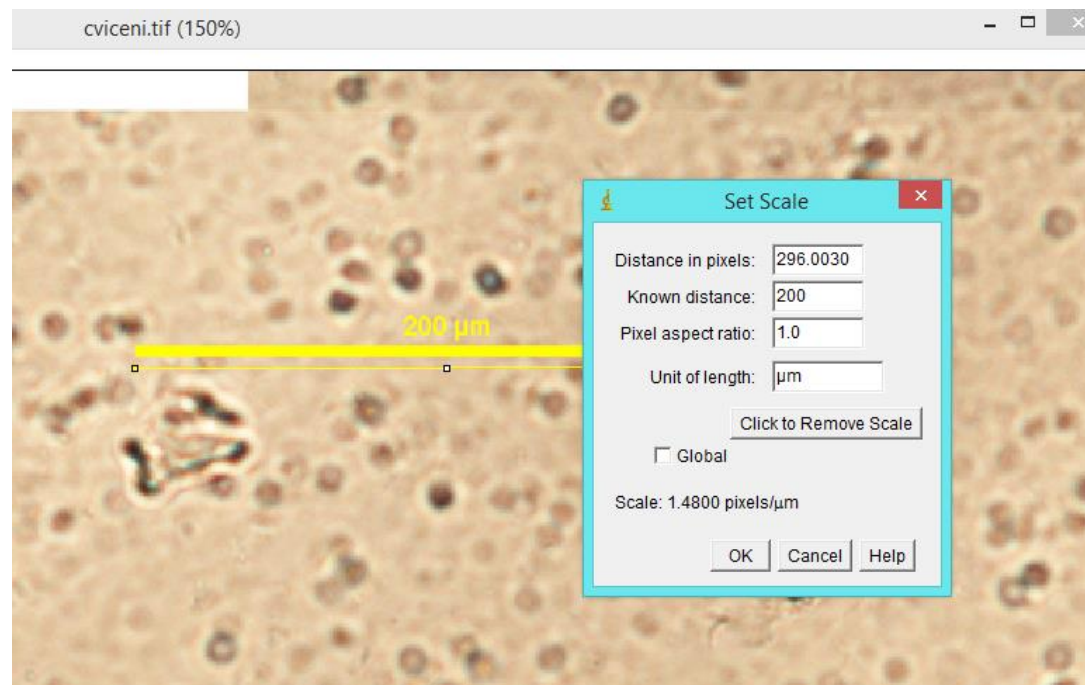
Kalibrace snímku

- Otevřít soubor *.tiff* v *ImageJ*
- pomocí funkce **Straight line** nakreslete úsečku spojující konce měřítka



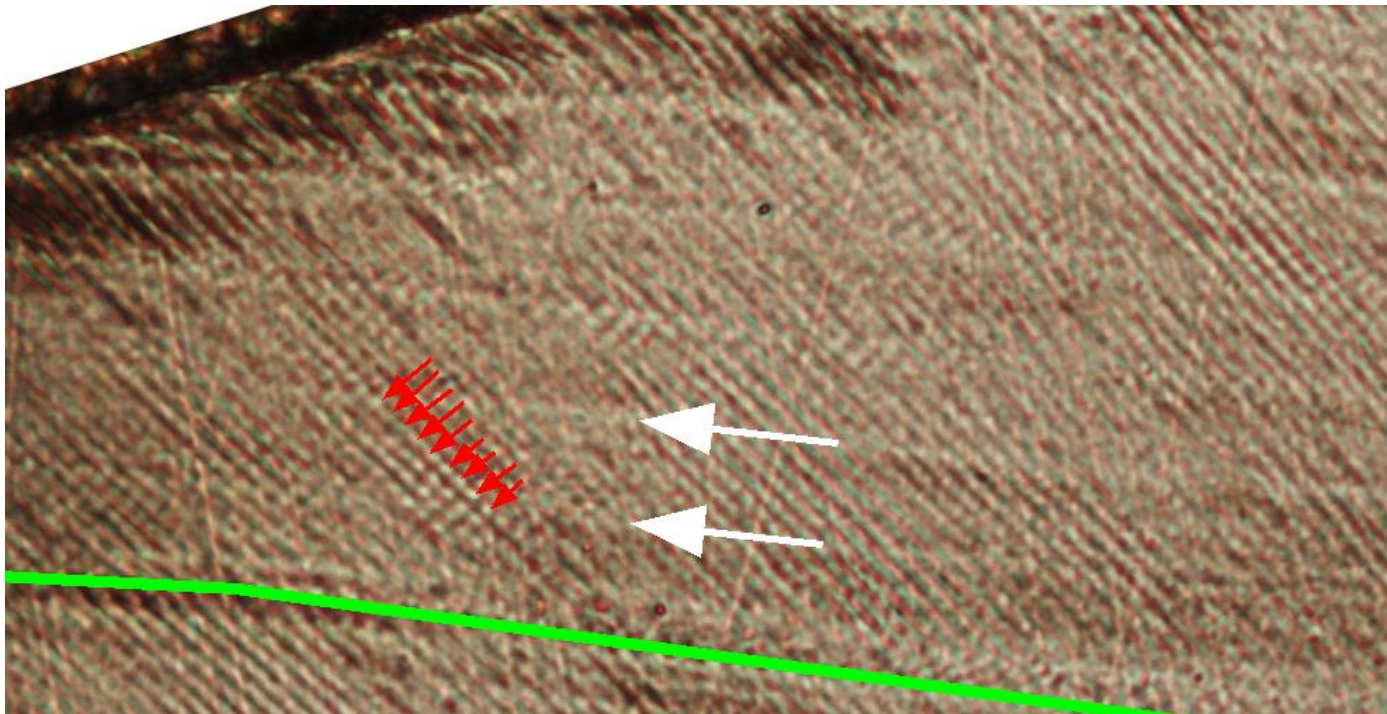
Kalibrace snímku

Analyze -> Set scale -> do kolonky **Known distance vepište známou vzdálenost (200 μm)**



1. Periodicita

Spočítejte počet příčných linií (červená šipka) mezi vybranými dvěma Retiusovými liniemi (bílá šipka)

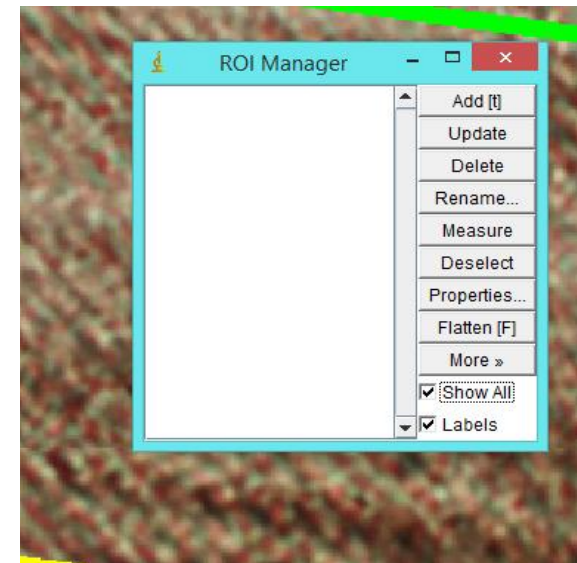
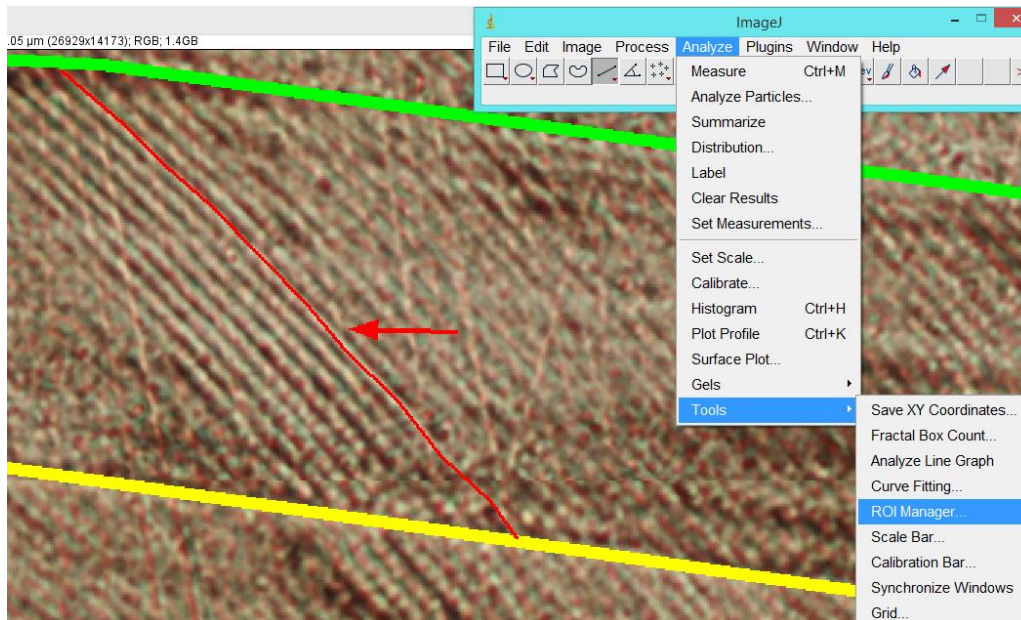


Počet měření: 5 v různých částech laterální skloviny

2. Míra denní sekrece

Pro každou oblast naměřte délku několika skupin příčných linií v okolí prizmatu táhnoucího se od jedné stresové linie ku druhé:

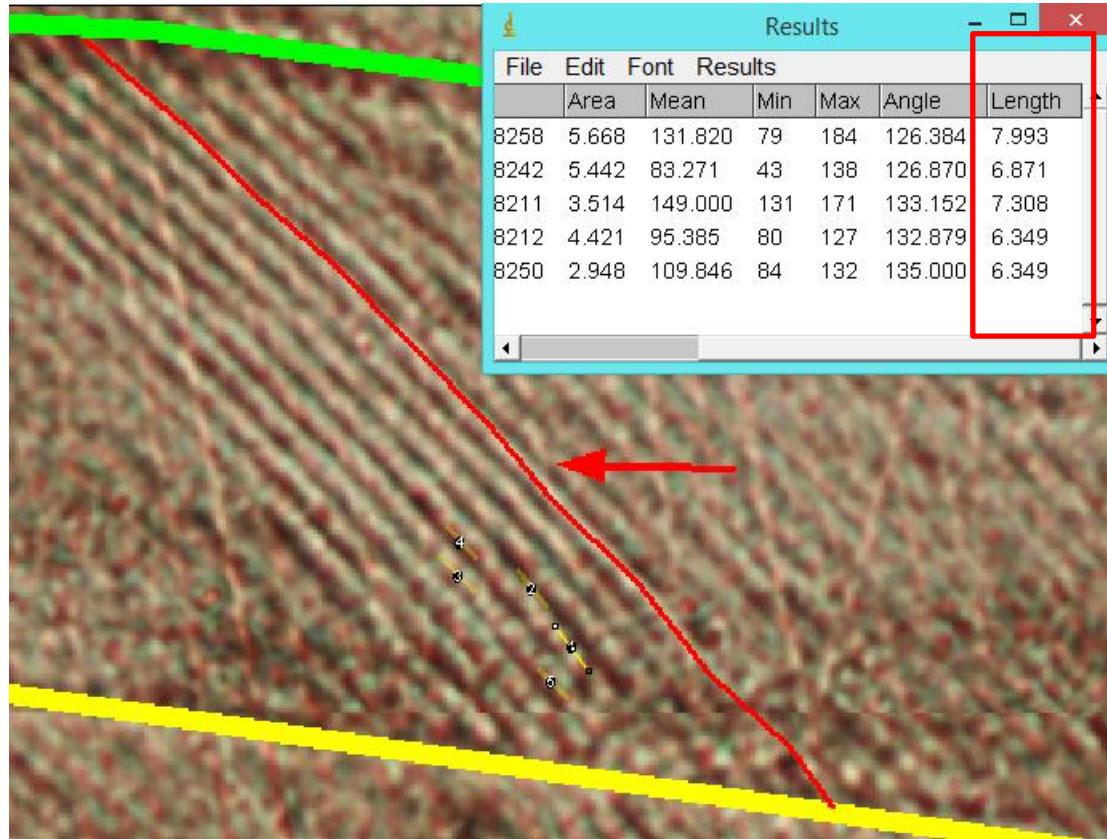
Otevřít **ROI Manager** -> zaškrtnout **Show all** a **Labels**



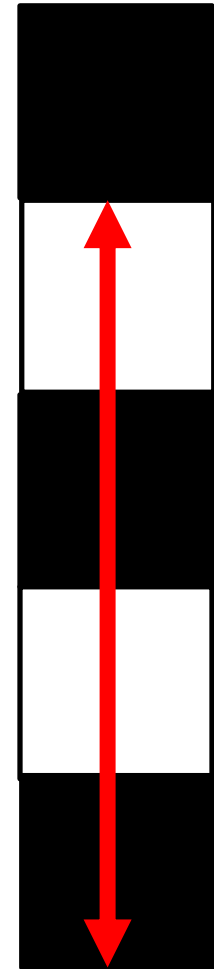
2. Míra denní sekrece

- Změřit délku vždy dvou denních přírůstků v okolí prizmy (kliknutím na „t“ se měření uloží do ROI Manageru)
- kliknout na **Measure** -> v tabulce **Results** ve sloupci **Length** jsou výsledné délky **dvou denních** přírůstků
- Vložit data do excelu a vypočítat průměrnou hodnotu jednoho denního přírůstku pro danou oblast

- **Segmented line** -> vyznačit sklovinné prizma a změřit jeho délku (přes **Measure**), vydelit velikostí DSR pro danou oblast – zapsat do excelu do příslušné kolonky

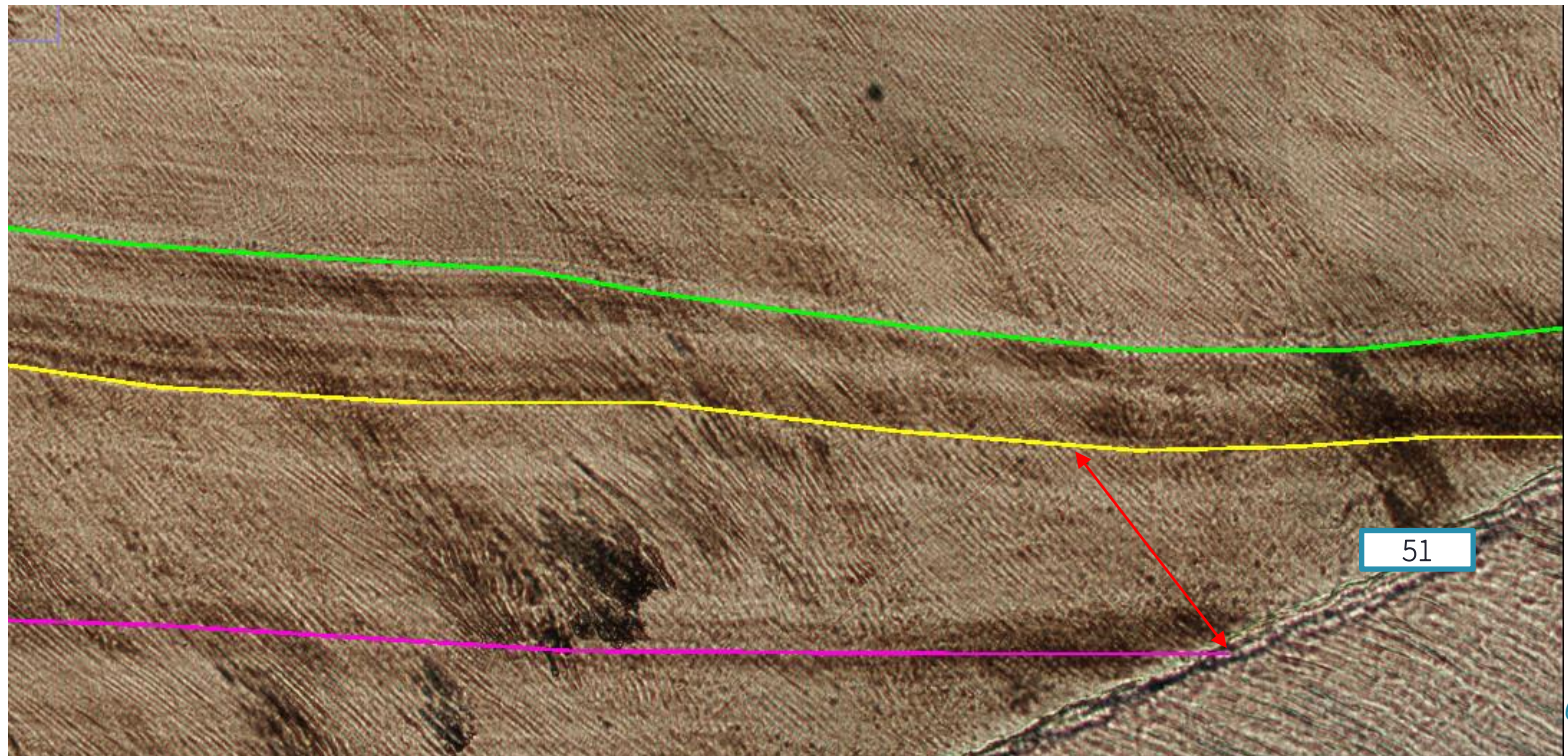


- Zelená** a **žlutá** linie – akcentovaná/stresová linie
- Červená** linie – sklovinné prizma
- Žluté úsečky** s číslama – 2 po sebe jdoucí denní přírustky

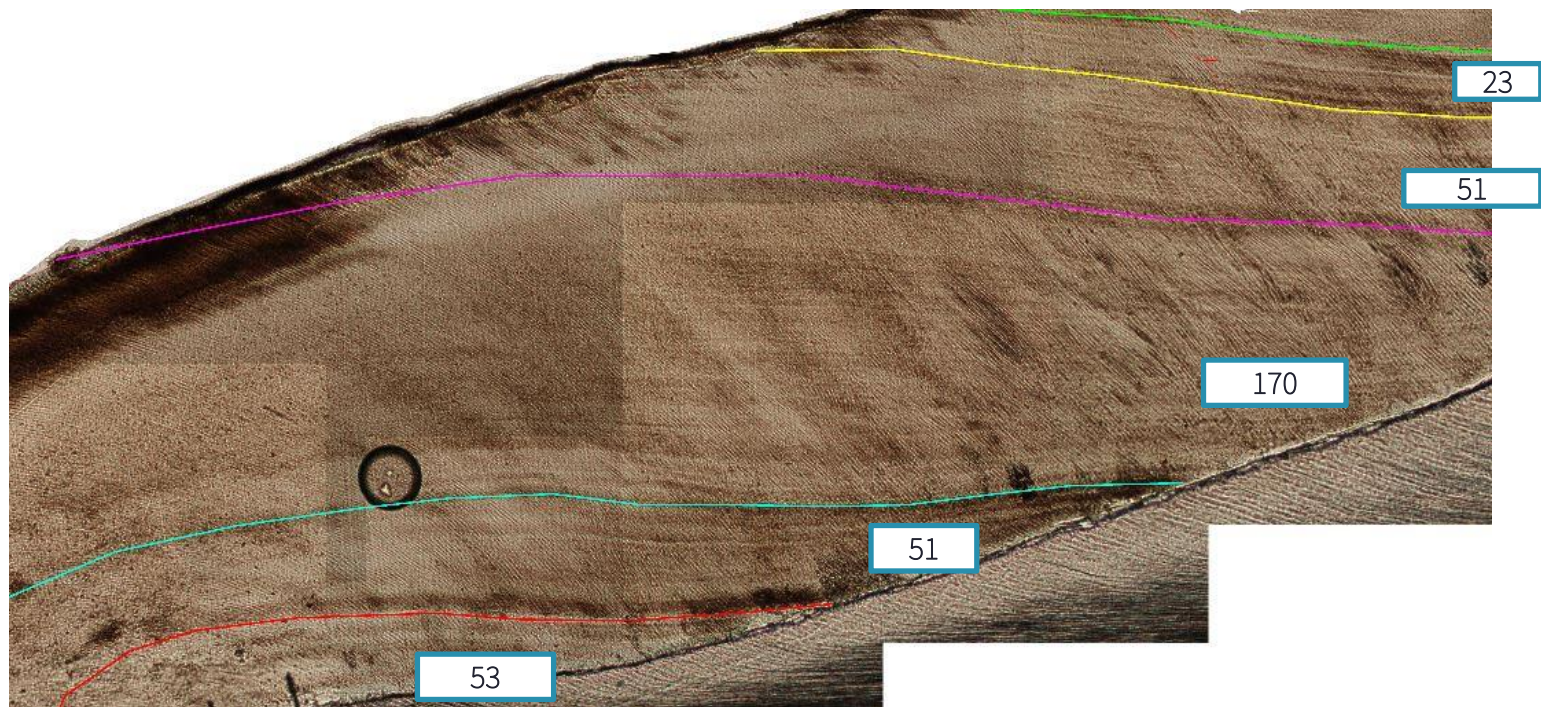


3. Časování stresových událostí

Čas mezi dvěma stresovými událostmi v dnech -> vzdálenost po prizmě mezi dvěma vybranými stresovými liniemi podělená mírou denní sekrece



3. Časování stresových událostí



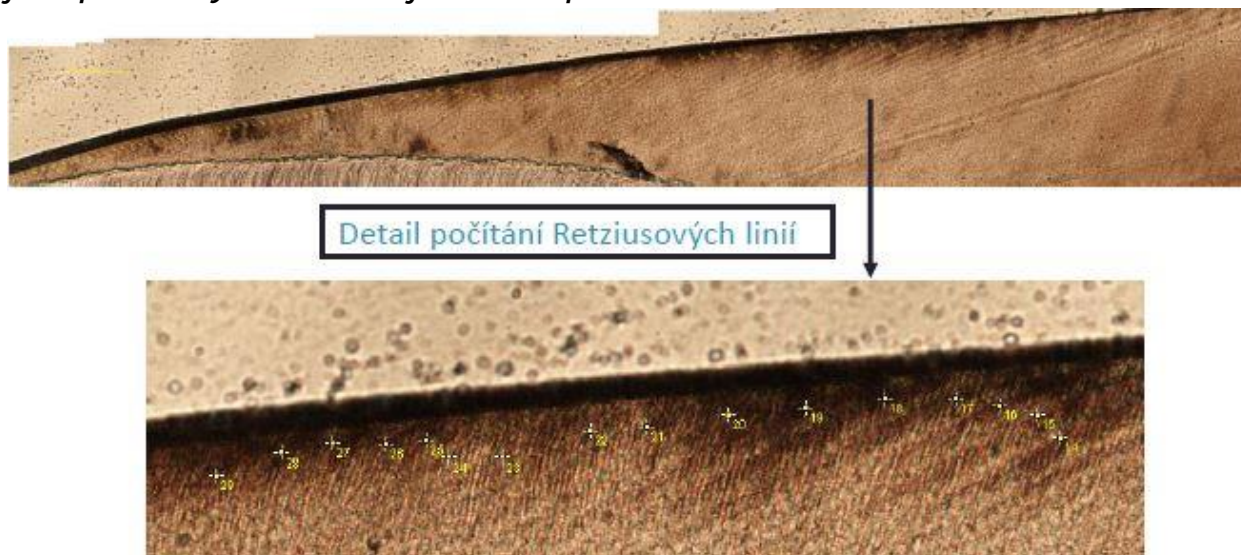
4. Délka formování korunky

Laterální část skloviny:

- Spočítejte počet Retziusových linií v laterální části skloviny po první výraznou stresovou linii

Pomocí funkce **Multi-point Tool** vložte body na všechny Retziusovy linie dané části

- Jejich počet vynásobte zjištěnou periodicitou



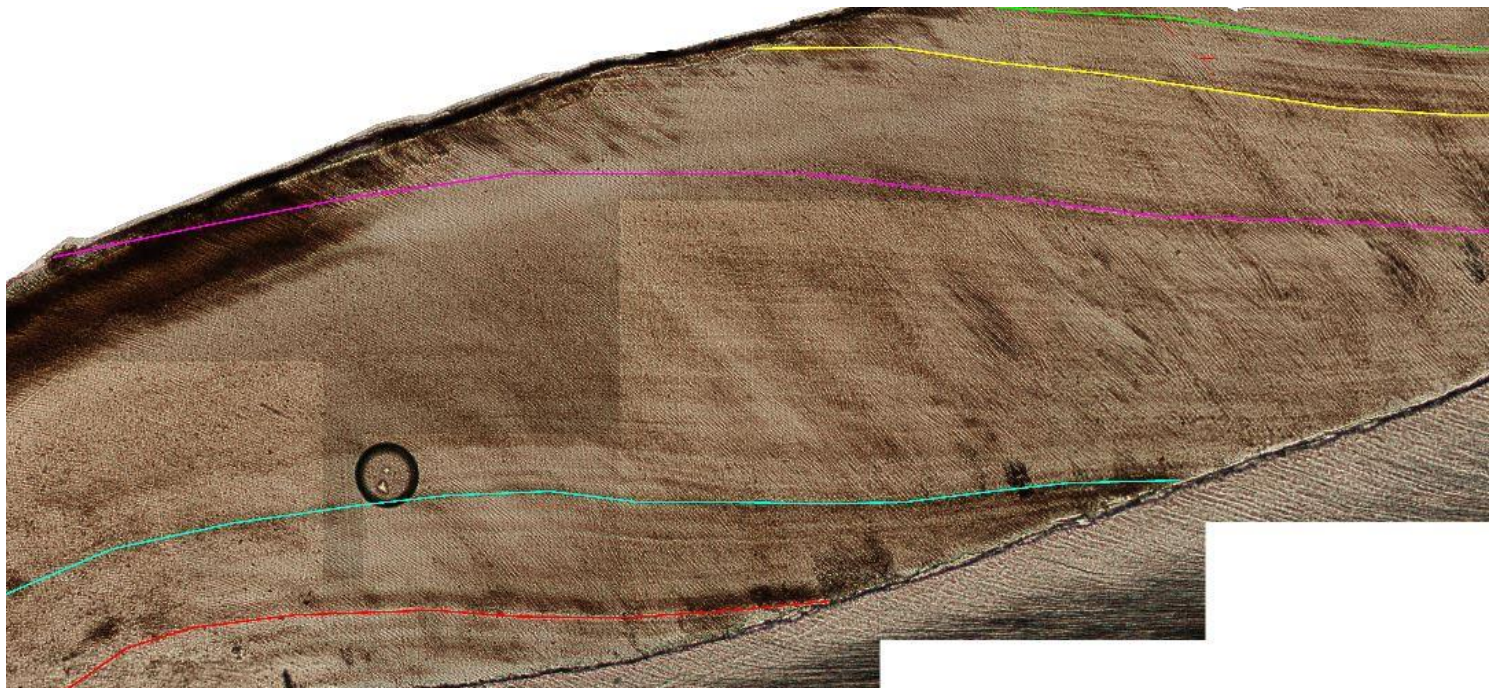
4. Délka formování korunky

Hrbolková částskloviny:

- Sečtěte zjištěné počty dní uplynulé mezi všemi stresovými událostmi

Celková délka:

- Součet počtu dní formování laterální a hrbolkové části skloviny



Výsledky

Zapsat do sešitu (.xls)

Literatura

- DEAN, M. C., 2000. Incremental markings in enamel and dentine; what they can tell us about the way teeth grow. In: M. TEAFORD, M. MEREDITH SMITH a M. FERGUSON, ed. *Development, Function and Evolution of Teeth*. B.m.: Cambridge University Press, s. 119–130
- DIRKS, Wendy, Donald J. REID, Clifford J. JOLLY, Jane E. PHILLIPS-CONROY a Frederick L. BRETT, 2002. Out of the mouths of baboons: stress, life history, and dental development in the Awash National Park hybrid zone, Ethiopi
- HILLSON, Simon. *Tooth development in human evolution and bioarchaeology*. 1 st pub. Cambridge: Cambridge University Press, 2014. vii, 307. ISBN 9781107011335
- HUPKOVÁ, Adela, KRÁLÍK, Miroslav, 2015. Mikrostruktura tvrdých zubních tkání. Výukový atlas a metodická příručka pro antropology
- FITZGERALD, Charles M. a Jerome C. ROSE, 2007. Reading Between the Lines: Dental Development and Subadult Age Assessment Using the Microstructural Growth Markers of Teeth. In: *Biological Anthropology of the Human Skeleton*. B.m.: Wiley-Blackwell, s. 237–263. ISBN 978-0-470-24584-2.
- FITZGERALD, Charles M. a Shelley R. SAUNDERS, 2005. Test of histological methods of determining chronology of accentuated striae in deciduous teeth. *American Journal of Physical Anthropology*. 127(3), 277–290. ISSN 0002-9483.
- Kolektív autorov (Držík, M – Plecenik, A – Zahoran, M – Chlpik, J – Mach, L' – Bohunický, B – Varga, P – Gregor, M – Anetta, M) 2008. *Moderná mikroskopia a digitálne spracovanie obrazu*. Skripta, Bratislava: FMFI UK. ISBN: 978-80-89186-37-2. [online] http://www.mikroskopia.sk/materials/skripta_mikroskopia.pdf
- MAHONEY, Patrick, 2012. Incremental enamel development in modern human deciduous anterior teeth. *American Journal of Physical Anthropology*. 147(4), 637–651. ISSN 1096-8644.
- Optoteam, s.r.o. 2004. Základní metody světelné mikroskopie [online] www.are.cz/data/file/zakladni_metody_svetelne_mikroskopie.pdf
- ŽADZIŇSKA, Elżbieta, Wiesław LORKIEWICZ, Marta KUREK a Beata BOROWSKA-STRUGIŇSKA, 2015. Accentuated lines in the enamel of primary incisors from skeletal remains: A contribution to the explanation of early childhood mortality in a medieval population from Poland. *American Journal of Physical Anthropology*. 157(3), 402–410. ISSN 1096-8644.

